



Tiago Manuel Costa Pinheiro

Licenciatura em Bioquímica

**Identificação de novos genes de
susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caracterização funcional do gene *C8orf48***

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Branca Cavaco, Unidade de Investigação em
Patobiologia Molecular (UIPM), Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Francisco Gentil, EPE (IPOLFG)

Júri:

Presidente: Doutora Paula Gonçalves

Arguente: Doutor Hugo Prazeres



**FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA**

Setembro 2015

2015

Identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caracterização funcional do gene *C8orf48*





Tiago Manuel Costa Pinheiro

Licenciatura em Bioquímica

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tíróide familiar - caracterização funcional do gene *C8orf48*

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Genética Molecular e Biomedicina

Orientadora: Doutora Branca Cavaco, Unidade de Investigação em
Patobiologia Molecular (UIPM), Instituto Português de Oncologia de Lisboa
Francisco Gentil, EPE (IPOLFG)

Júri:

Presidente: Doutora Paula Gonçalves

Arguente: Doutor Hugo Prazeres



Setembro 2015

Identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar – caracterização funcional do gene *C8orf48*

Copyright Tiago Manuel Costa Pinheiro, FCT/UNL, UNL

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

No término deste trabalho, quero começar por agradecer a todas as pessoas que permitiram a sua concretização, em especial à minha orientadora, Doutora Branca Cavaco, pela oportunidade de trabalhar no grupo de Endocrinologia Molecular do IPO-Lisboa, pelo seu constante apoio, incentivo e pelo seu rigor de trabalho, que me permitiu desenvolver melhores competências na área da Ciência e Oncologia. Ao Doutor Valeriano, pela sua disponibilidade e curiosidade com o desenvolver do projecto.

Quero ainda agradecer aos meus colegas de grupo, nomeadamente, às Doutoradas Margarida Moura e Ana Luísa pela ajuda e ensinamentos que me transmitiram ao longo do ano. Gostaria de agradecer também à Doutora Ana Morgado e à Mestre Ana Matias pelo apoio na realização de técnicas essenciais para o desenvolvimento deste projecto.

Aos restantes elementos do UIPM, em especial às futuras Mestres, Liliana e Márcia, um obrigado pela simpatia e pela partilha de ideias.

Um agradecimento muito especial a toda a família que se disponibilizou para este estudo, pois é graças a elas e a pensar nelas que este projecto se desenvolveu.

Aos amigos de longa data, em especial ao Pedro, Graça e Nita, o meu obrigado pela paciência de me aturarem, por serem quem são e principalmente, pela amizade que certamente perdurará para sempre.

A todos os amigos que criei durante o meu percurso académico, um muito obrigado pelos momentos passados. Felizmente, a lista é extensa e difícil de enumerar sem esquecer alguém, mas estas pessoas sabem quem são. Foram os cafés de convívio, as noites de estudo, os jantares “pré/pós-festa” e as férias em conjunto com vocês que fez com que a FCT se tornasse na minha casa.

À AEFCT, tenho a agradecer a todos os dirigentes com quem trabalhei por me terem tornado no Homem que sou hoje. Foi graças ao trabalho desenvolvido, às pessoas que conheci e às amizades criadas que me ajudou a crescer como pessoa. Um grande obrigado em especial à minha equipa pelo esforço, dedicação e autonomia que permitiu com que a AEFCT crescesse e se desenvolvesse ainda mais pelos estudantes.

À minha família, em especial aos meus avós, tios e primos, obrigado pelo apoio, carinho e orgulho em ser o primeiro “Sr. Doutor” da família.

Aos meus pais, quero agradecer por todas palavras de ternura e encorajamento, pelo carinho e amor transmitido, pela confiança que depositam em mim, pelo apoio e incentivo nas decisões tomadas e pelo esforço incansável da vossa parte.

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar – caraterização funcional do gene *C8orf48*

RESUMO

As formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (*Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma* - FNMTc) representam 5 a 10% das neoplasias da tiróide. Foram já mapeados 9 *loci* de susceptibilidade para o FNMTc, no entanto, até à data, apenas os genes *DICER1*, *SRGAP1*, *NKX2-1*, *FOXE1* e *HABP2* foram identificados. O envolvimento de diferentes *loci* sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTc, contudo, a sua base molecular, permanece essencialmente desconhecida.

Através da sequenciação global do exoma, identificou-se uma nova variante (c.65C>T, p.T22I) no gene *C8orf48*, que segregava com a doença na família. A proteína codificada pelo gene *C8orf48* interage com proteínas envolvidas na via de sinalização Wnt (*Wingless-Type MMTV integration site family*)..

Este projecto teve como objectivo a realização de estudos funcionais para a variante p.T22I do gene *C8orf48*, em diferentes modelos celulares [células humanas de carcinoma do colo uterino (HeLa), células foliculares de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (PCCL3), fibroblastos embrionários de *Mus musculus* (NIH 3T3) e células humanas de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1)].

Estudos em células NIH 3T3 sugeriram que a variante p.T22I (MUT) não promove a proliferação e migração celular. Estes resultados poderão estar relacionados com diferentes condicionantes experimentais, podendo também dever-se à homologia de cerca de 60% entre o gene *C8orf48* de murganho (endógeno) e o gene *C8orf48* humano.

Estudos preliminares sugeriram que a expressão exógena do gene *C8orf48*, em células NIH 3T3, poderá afectar a expressão da β -catenina, apoiando o seu envolvimento na via de sinalização Wnt. Em ensaios preliminares realizados em células TPC-1, o silenciamento do gene *C8orf48* induziu a apoptose (tardia).

Em estudos futuros, será importante prosseguir o estudo do efeito do silenciamento do gene *C8orf48* e da sua sobre-expressão (nas formas *Wild type* e MUT), na morte celular para identificar os potenciais efectores celulares pró- e/ou anti-apoptóticos envolvidos neste processo, e na expressão da β -catenina (via Wnt).

A clarificação do papel do gene *C8orf48* poderá contribuir para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na etiologia do FNMTc. A identificação de novos genes de susceptibilidade para o FNMTc permitirá a identificação precoce dos portadores de mutação, podendo ainda contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Palavras-Chave: tiróide, cancro, carcinoma não-medular da tiróide familiar (FNMTc), *C8orf48*, ensaios funcionais.

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar – caraterização funcional do gene *C8orf48*

ABSTRACT

The familial forms of non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc) represent 5% to 10% of thyroid carcinomas. Nine susceptibility *loci* have already been mapped, however, to date, only the *DICER1*, *SRGAP1*, *NKX2-1*, *FOXE1* and *HABP2* susceptibility genes were identified. The involvement of distinct chromosomal *loci* suggests the existence of genetic heterogeneity for FNMTc, however, its molecular basis remains essentially unknown.

Using the new technology of Whole-Exome Sequencing (WES), we previously identified a novel variant (c.65C>T, p.T22I) in the *C8orf48* gene, which segregated with the disease in the family. The *C8orf48* encoded protein interacts with proteins involved in Wnt signaling pathway.

In this project, we aimed to perform functional studies of the *C8orf48* p.T22I variant, in different cell models [human cervix carcinoma cell line of (HeLa), normal thyroid follicular cells (PCCL3), mouse embryo fibroblast cell line (NIH 3T3), and a human papillary thyroid carcinoma cell line (TPC-1)].

Studies performed with NIH 3T3 cells suggested that the p.T22I variant (MUT) does not promote cell proliferation and migration. These results may be related to different experimental conditionings, and may also be due to the homology of about 60% between the mouse *C8orf48* gene (endogenous) and the human *C8orf48* gene.

Preliminary studies suggested that exogenous expression of the *C8orf48* gene in NIH 3T3 cells may affect the expression of β -catenin, supporting its involvement in the Wnt signaling pathway. In preliminary assays performed in TPC-1 cells, we observed that *C8orf48* gene silencing induced late apoptosis.

In future studies, it will be important to continue the study of the effect of silencing the *C8orf48* gene, and of its overexpression (in the Wild type and MUT forms), in cell death to identify potential pro- and/or anti-apoptotic cell effectors involved in this process, and in the expression of β -catenin (Wnt pathway).

Clarification of the role of the *C8orf48* gene may contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved in the etiology of FNMTc. The identification of novel susceptibility genes for FNMTc will allow the early identification of mutation carriers, and may contribute to the development of new therapeutic strategies.

Key Words: thyroid, cancer, familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc), *C8orf48*, functional studies.

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	iii
ABSTRACT	v
ÍNDICE GERAL	vii
ÍNDICE FIGURAS	ix
ÍNDICE TABELAS	xi
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES	xiii
I INTRODUÇÃO	1
1 Tumorigénese	1
2 Embriogénese, anatomia e função da glândula tiroideia	6
3 Neoplasias da tiróide	7
3.1 Carcinomas medulares da tiróide (MTC)	9
3.2 Adenomas foliculares da tiróide (FTA)	10
3.3 Carcinomas não-medulares da tiróide (NMTC)	10
3.3.1 Carcinomas Papilares (PTC)	10
3.3.2 Carcinomas Foliculares (FTC)	11
3.3.3 Carcinomas Pouco Diferenciados (PDTC)	12
3.3.4 Carcinomas Anaplásicos (ATC)	12
4 Formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTc)	15
4.1 Aspectos clínicos do FNMTc	15
4.2 Loci de susceptibilidade para o FNMTc	15
4.2.1 Locus MNG1	16
4.2.2 Locus TCO	16
4.2.3 Locus fPTC/PRN	16
4.2.4 Locus NMTC1	16
4.2.5 Locus FTEN	17
4.2.6 Outros loci de susceptibilidade	17
4.3 miRNAs para os FNMTc	17
4.4 Telómeros e telomerase nos FNMTc	18
5 Genes candidatos para o FNMTc	20
5.1 Gene <i>C8orf48</i>	22
6 Utilização de novas tecnologias de sequenciação na identificação de genes de susceptibilidade para FNMTc	24
6.1 Sequenciação global do exoma (WES)	24
Objectivos	25
II MATERIAIS E MÉTODOS	27
1 Amostras biológicas	27
2 Cultura de células	28
2.1 Descongelamento de células	29
2.2 Criopreservação das células	29
2.3 Propagação e expansão das células	29
3 Transfecção de células HeLa, PCCL3, NIH 3T3 e TPC-1 com vectores derivados do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	30
3.1 Transfecções transitórias	30
3.2 Estabelecimento de pools de células HeLa e NIH 3T3 com expressão estável de vectores derivados do plasmídeo pcDNA3NeoMyc	31

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

3.3	Transfecções transientes do siRNA em células TPC-1	31
3.3.1	Transfecção transiente de vectores derivados de pcDNA3NeoMyc em células TPC-1	32
4	Extração de RNA	32
5	Quantificação espectralométrica de RNA	33
6	Síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA	34
7	Amplificação de cDNA por PCR	34
7.1	Optimização das condições de PCR	35
8	Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose	36
9	PCR quantitativo em tempo real	37
9.1	Funcionamento do PCR quantitativo em tempo real	37
9.2	Seleção química do PCR quantitativo em tempo real	39
10	Western Blot	40
11	Ensaio de Proliferação Celular	41
11.1	Contagem directa em hemocítmetro	41
12	Ensaio de <i>Wound Healing</i>	43
13	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo	44
14	Análise da morte celular por citometria de fluxo	45
15	Análise Estatística	46
III	RESULTADOS	47
1	Estudo do efeito da variante p.T22I no gene <i>C8orf48</i> na tumorigénese	47
1.1	Preparação de linhas celulares tumorais e de células da tiróide com expressão transitória e estável dos vectores pcDNA3NeoMyc, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT	48
1.1.1	Linha celular tumoral HeLa	48
1.1.2	Células PCCL3	51
1.1.3	Linha celular tumoral TPC-1	52
1.1.4	Linha celular tumoral NIH 3T3	52
1.2	Estudos funcionais da variante p.T22I (c.65C>T) do gene <i>C8orf48</i> em pools de células NIH 3T3	54
1.2.1	Quantificação dos níveis de expressão relativos do gene <i>C8orf48</i> humano nas pools de células NIH 3T3	54
1.2.2	Ensaio de proliferação celular com pools de células NIH 3T3	55
1.2.3	Ensaio de migração celular com pools de células NIH 3T3	56
1.2.4	Estudo da expressão da proteína β -catenina endógena em pools de células NIH 3T3	57
1.3	Estudo do efeito do silenciamento do gene <i>C8orf48</i> endógeno em células TPC-1	58
1.3.1	Quantificação dos níveis de expressão relativos do gene <i>C8orf48</i> endógeno humano após transfecção transitória de células TPC-1 com siRNA	59
1.3.2	Estudo da proliferação celular por citometria de fluxo	59
1.3.3	Ensaio de morte celular por citometria de fluxo	60
1.4	Estudo do efeito da reposição da expressão do gene <i>C8orf48</i> após o seu silenciamento	62
1.4.1	Ensaio de ciclo celular	62
IV	DISCUSSÃO	63
1	Estudo dos níveis de expressão da proteína <i>C8orf48</i> resultante de transfecções transitórias e estáveis de linhas celulares tumorais (HeLa, NIH 3T3 e TPC-1) e de células foliculares de tiróide normal (PCCL3)	64
2	Estudo do papel da variante p.T22I do gene <i>C8orf48</i> na proliferação e migração em pools de NIH 3T3	65
3	Estudo do papel do gene <i>C8orf48</i> na viabilidade e morte celular em células TPC-1	66
V	CONCLUSÃO	67
VI	BIBLIOGRAFIA	69
VII	ANEXOS	77

ÍNDICE FIGURAS

FIGURA I-1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA HIPÓTESE <i>TWO-HIT</i> FORMULADA POR KNUDSON.....	2
FIGURA I-2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS CAPACIDADES ADQUIRIDAS PELAS CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE POSSIBILITAM O DESENVOLVIMENTO E A DISSEMINAÇÃO DOS TUMORES.....	3
FIGURA I-3 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS NOVAS CAPACIDADES NECESSÁRIAS PARA A PROGRESSÃO TUMORAL.....	4
FIGURA I - 4 - LOCALIZAÇÃO ANATÓMICA DA GLÂNDULA TIROIDEIA.....	6
FIGURA I-5 – REGULAÇÃO HORMONAL DOS EIXOS HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-TIRÓIDE.....	7
FIGURA I-6 – ESQUEMA DA PROGRESSÃO E DESDIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS FOLICULARES DERIVADAS DO CANCRO DA TIRÓIDE.....	8
FIGURA I-7 – ALTERAÇÕES MOLECULARES ENVOLVIDAS NO DESENVOLVIMENTO DOS ATC E PDTC.....	14
FIGURA I-8 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA DE TRANSDUÇÃO DE SINAL WNT.....	24
FIGURA II-1 – GRÁFICO REPRESENTATIVO DA AMPLIFICAÇÃO POR QRT-PCR.....	37
FIGURA II-2 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA <i>SYBR GREEN I</i>	39
FIGURA II-3 -REPRESENTAÇÃO DE UM HEMOCITÓMETRO.....	43
FIGURA II-4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PLACA USADA PARA O ENSAIO DE <i>WOUND HEALING</i>	43
FIGURA II-5 – HISTOGRAMA DE UMA DAS AMOSTRAS ANALISADAS (TRANSFEÇÃO CÉLULAS TPC-1 COM CONTROLO NEGATIVO SIRNA).....	44
FIGURA III-1 - ÁRVORE GENEALÓGICA DA FAMÍLIA 1, NA QUAL FOI IDENTIFICADA UMA NOVA VARIANTE (C.65C>T) NO GENE <i>C8ORF48</i>	48
FIGURA III-2 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE.....	50
FIGURA III-3 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE.....	50
FIGURA III-4 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM <i>POOLS</i> DE CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS ESTAVELMENTE.....	50
FIGURA III-5 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM <i>POOLS</i> DE CÉLULAS HELA TRANSFECTADAS ESTAVELMENTE.....	50
FIGURA III-6 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS PCCL3 TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE.....	51
FIGURA III-7 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS PCCL3 TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE.....	52
FIGURA-III-8 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS NIH 3T3 TRANSFECTADAS TRANSITORIAMENTE.....	53
FIGURA-III-9 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS NIH 3T3 TRANSFETADAS TRANSITORIAMENTE.....	53

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

FIGURA -III-10 – ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MYC-C8ORF48 POR WESTERN BLOT EM POOLS DE CÉLULAS NIH 3T3	54
FIGURA-III-11 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVOS DO GENE <i>C8ORF48</i> NAS <i>POOLS</i> TRANSFECTADAS COM OS PLASMÍDEOS WT, MUT E PCDNA3	55
FIGURA-III-12 – ESTUDO DO EFEITO DA VARIANTE P.T22I NO GENE <i>C8ORF48</i> NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	56
FIGURA-III-13 – ESTUDO DO EFEITO DA VARIANTE P.T22I NO GENE <i>C8ORF48</i> NA MIGRAÇÃO CELULAR ..	57
FIGURA III-14 - ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA β -CATENINA POR WESTERN BLOT EM <i>POOLS</i> DE CÉLULAS NIH 3T3	58
FIGURA -III-15 – TAXA DE EXPRESSÃO RELATIVA DA PROTEÍNA β -CATENINA NAS 3 <i>POOLS</i> DE CÉLULAS NIH 3T3 (PCDNA3, WT, MUT).....	58
FIGURA - III-16 - NÍVEIS DE EXPRESSÃO RELATIVOS DO GENE <i>C8ORF48</i> NAS CÉLULAS TPC-1 24H E 48 H APÓS TRANSFEÇÃO COM O SIRNA-C8ORF48 E SIRNA-	59
FIGURA-III-17 – EFEITO DO SILENCIAMENTO DO GENE <i>C8ORF48</i> NO CICLO CELULAR	60
FIGURA-III-18 – EFEITO DO SILENCIAMENTO DO GENE <i>C8ORF48</i> NA MORTE CELULAR	61
FIGURA-III-19 - EFEITO NO CICLO CELULAR DA REPOSIÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>C8ORF48</i>	62

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

ÍNDICE TABELAS

TABELA I – ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS DIFERENTES TIPOS DE TUMORES DA GLÂNDULA TIROIDEIA.....	9
TABELA II – TUMORES DA TIRÓIDE E SUAS CARACTERÍSTICAS (ADAPTADO DE XING, 2013).....	13
TABELA III – <i>LOCI</i> E GENES DE SUSCEPTIBILIDADE PARA O FNMTTC (ADAPTADO DE NAVAS-CARRILLO <i>ET AL.</i> ,2014).	19
TABELA IV – CONDIÇÕES PARA OPTIMIZAÇÃO DA TRANSFEÇÃO DAS CÉLULAS PCCL3	31
TABELA V - FUNÇÃO DOS TAMPÕES UTILIZADOS PARA EXTRAÇÃO DE RNA	33
TABELA VI - TAMPÕES E CONCENTRAÇÕES FINAIS DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA ENSAIOS DE CICLO E MORTE CELULAR.....	77
TABELA VII - SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> NO ESTUDO DO SILENCIAMENTO DO GENE <i>C8ORF48</i> , EM CÉLULAS TPC-1.....	77
TABELA VIII - SEQUÊNCIA DOS <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NO ESTUDO DO GENE <i>C8ORF48</i> , EM <i>POOLS</i> DE NIH 3T3	77
TABELA IX - INFORMAÇÕES SIRNA PARA O GENE <i>C8ORF48</i>	78
TABELA X – TAMPÕES E CONCENTRAÇÕES FINAIS DAS SOLUÇÕES UTILIZADAS PARA WESTERN BLOT ...	78

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E CONVENÇÕES

A	Resíduo de nucleótido contendo como base a adenina
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
ATC	Carcinoma anaplásico da tiróide (<i>Anaplastic Thyroid Carcinoma</i>)
BAX	<i>BCL2-Associated X Protein</i>
BCL-2	<i>B-Cell Lymphoma 2</i>
BER	Reparação por excisão de bases (<i>Base Excision Repair</i>)
BIM	<i>Bcl-2 Interacting Protein</i>
bp	Número de pares de resíduos de nucleótidos (<i>base pairs</i>)
BRAF	<i>Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1</i>
C	Resíduo de nucleótido contendo como base a citosina
C8orf48	<i>Chromosome 8 open reading frame 48</i>
Ca²⁺	lões de cálcio
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CDH1	<i>Cadherin 1, Type 1, E-Cadherin</i>
CDKN1	<i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i>
cDNA	DNA complementar de cadeia simples (<i>complementary DNA</i>)
CO₂	Dióxido de carbono
cm	Centímetro
cPTC	Carcinoma papilar da tiróide clássico
C_T	Ciclo de treshhold (<i>Threshold cycle</i>)
CTNNB1	<i>Catenin Beta 1</i>
ddNTP	Didesoxinucleótidos (<i>dideoxynucleotide</i>)
DEPC	Dietilpirocarbonato (<i>diethylpyrocarbonate</i>)
DICER1	<i>Dicer 1, ribonuclease type III</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido (<i>Dimethyl sulfoxide</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Trifosfato de desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DR	Reparação do DNA Direta (<i>Direct Repair</i>)
DTT	Ditiotreitol (<i>Dithiothreitol</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMT	Transição epitélio-mesenquimatosa (<i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
FAP	Polipose adenomatosa familiar (<i>Familial adenomatous polyposis</i>)
FBS	Soro fetal bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FMNG	Forma familiar de bócio multinodular (<i>Familial Multinodular Goiter</i>)
FMTc	Carcinoma medular da tiróide familiar (<i>Familial Medullary Thyroid Carcinoma</i>)
FNMTc	Forma familiar de NMTC (<i>Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma</i>)
FOXE1	<i>Forkhead box E1</i>

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

<i>fPTC/PRN</i>	<i>locus</i> do Carcinoma papilar da tiróide e da neoplasia papilar renal (<i>Papillary Thyroid Carcinoma and Papillary Renal Neoplasia locus</i>)
FTA	Adenoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Adenoma</i>)
FTC	Carcinoma folicular da tiróide (<i>Follicular Thyroid Carcinoma</i>)
FTEN	Neoplasias do epitélio folicular da tiróide (<i>Familial Thyroid Epithelial Neoplasia</i>)
f_vPTC	Carcinoma papilar da tiróide de variante folicular (<i>follicular variant of Pappilary Thyroid Carcinoma</i>)
g	Gramas
G	Resíduo de nucleótido contendo como base a guanidina
GSK3	Glicogénio sintase cinase-3 (<i>Glycogen Synthase Kinase-3</i>)
GWAS	Estudo de associação genética (<i>Genome-wide Association study</i>)
GWLS	Estudo de <i>linkage</i> do genoma (<i>Genome-wide linkage scan</i>)
h	Hora
HABP2	<i>Hyaluronan Binding Protein 2</i>
HeLa	Células humanas de carcinoma do colo uterino
IGF1/2	<i>Insulin-Like Growth Factor 1/2</i>
LOH	Perda de heterozigotia (<i>Loss Of Heterozygosity</i>)
LRP5/6	<i>Low-density Lipoprotein-Related Protein 5/6</i>
MAPK	Cascata mitogénica activada por proteínas cinase (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
Mb	Mega pares de bases
MDFI	<i>MyoD Family Inhibitor</i>
MEN	Neoplasia endócrina múltipla (<i>Multipe Endocrine Neoplasia type 2</i>)
m-	Mili
M	Molar
mg	miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
Mg²⁺	Iões de magnésio
microPTC	Micro carcinoma papilar da tiróide
miRNA	MicroRNA
MMR	<i>Mismatch Repair</i>
MNG	Bócio multinodular (<i>Multinodular Goiter</i>)
mRNA	RNA mensageiro
MTC	Carcinoma medular da tiróide (<i>MedullaryThyroid Carcinoma</i>)
MUT	Forma mutada de um gene ou proteína (<i>mutant</i>)
MYC	<i>Avian Myelocytomatosis viral oncogene homolog (v-myc)</i>
n	Nano
NCBS	Soro de vitela recém-nascida (<i>NewBorn Calf Serum</i>)
NER	Reparação por excisão de nucleótidos (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NGS	Sequenciação de próxima geração (<i>Next-Generation Sequencing</i>)
NIH 3T3	Fibroblastos embrionários de <i>Mus musculus</i>
NIS	Co-transportador de sódio/iodeto (<i>Sodyum Iodide Symporter</i>)
NKX2-1	<i>NKX homeobox 1</i>

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

NMTC	Carcinoma não-medular da tiróide (<i>Nonmedullary Thyroid Carcinoma</i>)
onc	variante oncogénica
OPTI-MEM	Meio de cultura (<i>OPTI Modified Eagle's Minimum Essential Medium</i>)
p	Braço curto do cromossoma
PAX8	<i>Paired box 8</i>
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (<i>Polimerase Chain Reaction</i>)
PDTC	Carcinoma pouco diferenciado da tiróide (<i>Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase, Catalytic Subunit Alpha</i>
PPARγ	<i>Peroxisome Proliferation-Activated Receptor type γ</i>
PPCL3	Células foliculares de tiróide normais de <i>Rattus norvegicus</i>
PPFP	Proteína de fusão PAX8/PPAR γ (<i>PAX8/PPARγ protein fusion</i>)
PRN	Carcinoma papilar renal (<i>Papillary renal neoplasm</i>)
PTC	Carcinoma papilar da tiróide (<i>Papillary Thyroid Carcinoma</i>)
PTEN	<i>Peroxisome Proliferation-Activated Receptor subtype γ</i>
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
q	Braço longo do cromossoma
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real (<i>quantitative real time PCR</i>)
RAS	<i>Rat sarcoma virus homolog</i>
RB	Retinoblastoma
RET	<i>REarranged during Transfection</i>
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
RT-PCR	Reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase após transcrição reversa (<i>Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction</i>)
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SLCT	células tumorais <i>Sertoli-Leydig</i> do ovário (<i>Sertoli-Leydig cell tumors</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleótido único (<i>Single nucleotide polymorphism</i>)
SRGAP1	<i>SLIT-ROBO Rho GTPase Activating Protein 1</i>
T	Resíduo de nucleótido contendo como base a timina
T3	Triiodotironina
T4	Tetraiodotironina
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCO	Carcinoma da tiróide com células oxifílicas (<i>Thyroid Carcinoma with Cell Oxyphilia</i>)
TP53	<i>Tumour Protein 53</i>
TPC-1	Linha celular de Carcinoma Papilar da Tiróide Humano
TRH	Hormona tireotrófica (<i>Tyrotropin Releasing Hormone</i>)
TRK	<i>Tropomyosin-Related Protein</i>
TSH	Tireotropina ou hormona estimuladora da tiróide (<i>Thyroid-Stimulating Hormone</i>)

Identificação de genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar –
caraterização funcional do gene *C8orf48*

U	Unidade de actividade enzimática
UTR	Região não traduzida (<i>UnTranslated Region</i>)
UV	Ultravioleta
VGFE-A	<i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>
WDTC	Carcinoma bem-diferenciado da tiróide (<i>Well Differentiated Thyroid Carcinoma</i>)
WES	Sequenciação global do exoma (<i>Whole-Exome Sequencing</i>)
WGS	Sequenciação global do genoma (<i>Whole-Genome Sequencing</i>)
Wnt	<i>WiNgless-Type MMTV integration site family</i>
WT	Forma não mutada de um gene ou proteína (<i>Wild Type</i>)
%(p/v)	Percentagem expressa em peso por volume
%(v/v)	Percentagem expressa em volume por volume
°C	Graus celsius
p	Pico
μ	Micro

I INTRODUÇÃO

1 Tumorigénese

A tumorigénese é um processo que envolve várias etapas, em que ocorrem alterações genéticas, cuja acumulação leva à transformação progressiva das células normais em células malignas (Spencer *et al.*, 2006). Assim, o estudo da tumorigénese a partir de modelos animais e humanos demonstrou que o desenvolvimento de um tumor é feito de uma forma análoga à evolução Darwiniana, na qual uma sucessão de alterações genéticas conferem uma vantagem selectiva para a célula, como por exemplo, estimulando a progressão da célula no ciclo celular, induzindo invasão e mobilidade celular e alterações da morfologia celular, inibindo a morte celular, levando desta forma, progressivamente, à transformação de células normais em células cancerígenas (Hanahan e Weinberg, 2000; Baba e Côté, 2007; Hanahan e Weinberg, 2011).

Alterações em oncogenes, genes supressores de tumor e em genes responsáveis pela reparação do DNA podem levar ao desenvolvimento tumoral (Vogelstein e Kinzler, 2004). Cerca de 90% das mutações que ocorrem nestes genes são somáticas, levando ao desenvolvimento de tumores esporádicos, enquanto que cerca de 10% das mutações são germinais, estando associadas à predisposição hereditária para o desenvolvimento de tumores (Vogelstein e Kinzler, 2004; Futreal *et al.*, 2004). Como já foi referido, uma neoplasia não resulta de uma única alteração genética, pois as células dos mamíferos possuem múltiplos mecanismos que as protegem contra os efeitos potencialmente letais das mutações em genes de susceptibilidade para o cancro, sendo assim necessário um conjunto de alterações em oncogenes, em genes supressores de tumor e/ou em genes de reparação do DNA para o desenvolvimento tumoral (Vogelstein e Kinzler, 2004).

Os oncogenes resultam de mutações activadoras de proto-oncogenes. As proteínas codificadas por estes genes induzem a uma excessiva proliferação celular, levando ao desenvolvimento tumoral (Lodish *et al.*, 2004). Este tipo de mutações actuam de forma dominante, sendo necessária apenas uma mutação num dos alelos para conferir à célula uma vantagem selectiva no crescimento (Vogelstein e Kinzler, 2004). A activação de oncogenes pode resultar de translocações cromossómicas, rearranjos entre genes, amplificações de genes ou de mutações pontuais intragénicas (Vogelstein e Kinzler, 2004).

Os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem a proliferação celular. As mutações que levam à perda de função destes genes actuam de forma recessiva, ou seja, ambos os alelos devem estar inactivos para promover o desenvolvimento do tumor (Lodish *et al.*, 2004).

Knudson, em 1971, formulou a hipótese *two-hit* para a inactivação dos genes supressores de tumor (Figura I-1). De acordo com esta hipótese, em indivíduos que herdassem uma cópia mutada do gene (o primeiro *hit* presente nas células germinais e, conseqüentemente, em todas as células do indivíduo), seria apenas necessária uma mutação somática que inactivasse a segunda cópia do gene (o segundo *hit*) para desencadear a tumorigénese por inactivação de um gene supressor de tumor. Por outro lado, nos tumores esporádicos, para a inactivação de um gene supressor de tumor, seria necessário que ocorressem duas mutações somáticas (Knudson, 1971). A inactivação da segunda

cópia do gene pode ocorrer através de diferentes mecanismos: mutações pontuais ou pequenas deleções que levam à perda da função da proteína que é codificada pelo gene; grandes deleções ou quebras de cromossomas que envolvem o gene supressor de tumor e que levam à perda de heterozigotia (LOH – *Loss of Heterozygosity*); recombinações somáticas em que a cópia do gene normal é substituída pela cópia mutante; hipermetilação de promotores de genes que conduz ao seu silenciamento transcripcional (Chial, 2008).

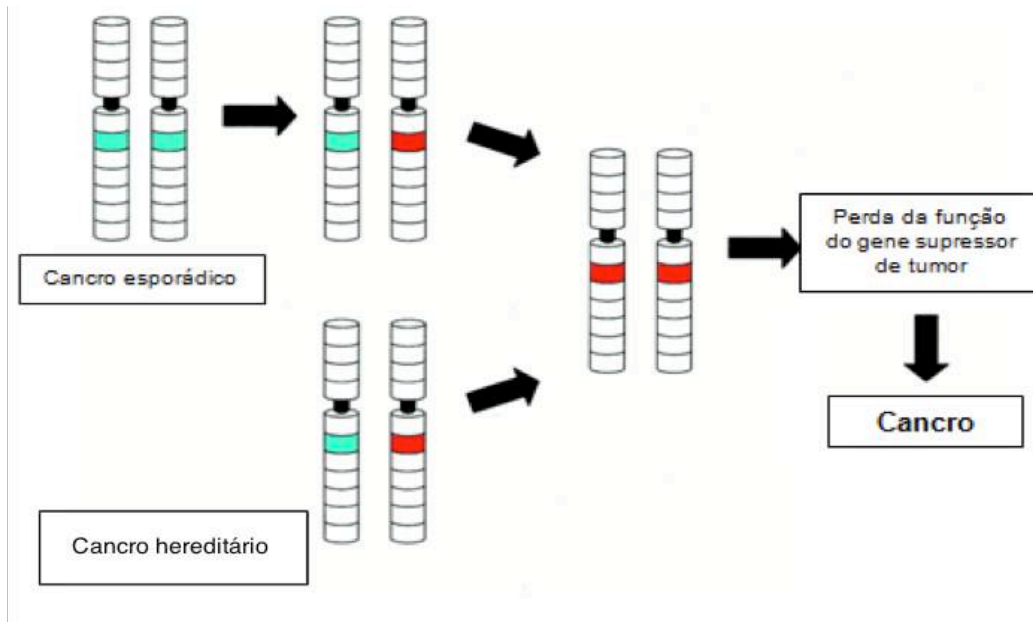


Figura I-1 - Representação esquemática da hipótese *two-hit* formulada por Knudson (adaptado de Gutmann, 2001).

Por fim, uma terceira classe de genes que estão envolvidos no desenvolvimento tumoral são os genes responsáveis pela reparação do DNA. A estrutura primária do DNA está constantemente sujeita a alterações por metabolitos celulares e agentes exógenos, que podem levar a alterações de bases ou então provocar alterações mais complexas, como deleções, fusões, translocações ou aneuploidias (Sancar *et al.*, 2004). O reconhecimento do DNA alterado para iniciar uma resposta molecular adequada pode ser feito por diversos mecanismos, tais como: a) reconhecimento directo; b) reconhecimento por “*multistep*”; c) reconhecimento por “*proxy*”; d) reconhecimento dos intermediários da reparação do DNA (Sancar *et al.*, 2004).

Relativamente às vias de reparação do DNA, estas podem ser divididas em cinco categorias: a) Reparação directa (DR - *Direct Repair*), por exemplo a reparação dos dímeros de pirimidina pela enzima fotoliase; b) Reparação por excisão de bases (BER - *Base Excision Repair*); c) Reparação por excisão de nucleótidos (NER - *Nucleotide Excision Repair*), sendo o principal mecanismo de reparação o de remoção de aductos de DNA formados pela exposição a radiação ou químicos; d) Reparação do *cross-link* do DNA (*Cross-link Repair*); e) Reparação de quebras da dupla cadeia e da Recombinação (*Double-Strand Break Repair and Recombinational Repair*) (Sancar *et al.*, 2004; Vogelstein e Kinzler, 2004).

Weinberg e Hanahan (2000 e 2011) propuseram que os tumores partilham entre si dez características, isto é, dez capacidades distintas e complementares que possibilitam o

desenvolvimento de uma neoplasia e a sua disseminação através de metástases (Hanahan e Weinberg, 2011). Estas características são as seguintes:

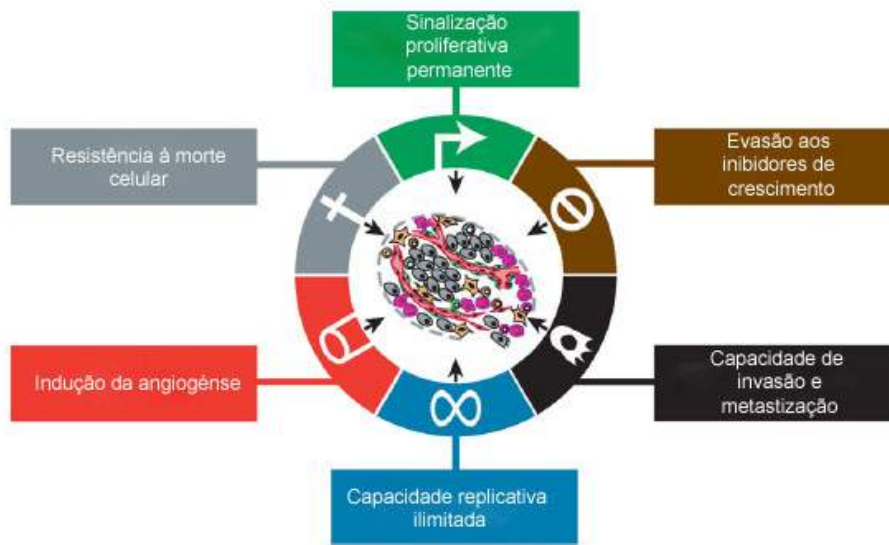


Figura I-2 - Diagrama esquemático das capacidades adquiridas pelas células neoplásicas que possibilitam o desenvolvimento e a disseminação dos tumores (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011)

- Sinalização proliferativa permanente: Para proliferar, as células necessitam de sinais de crescimento, garantindo assim a homeostasia celular e a manutenção da estrutura dos tecidos, sendo, portanto, um processo muito controlado. No entanto, as células tumorais possuem a capacidade de manter a sua proliferação de forma ilimitada, uma vez que geram muitos dos seus próprios sinais, tornando-se independentes do micro-ambiente que as rodeia. Através da desregulação destes sinais, as células tumorais podem adquirir a capacidade de manter a sinalização proliferativa, a partir da produção de factores de crescimento que passam a activar permanentemente os receptores membranares, ou através de envio de sinais para estimular a proliferação de células normais.

- Evasão aos inibidores de crescimento: As células tumorais têm a capacidade de desenvolver mecanismos envolvidos na capacidade de evasão a sinais anti-proliferativos, que nas células normais actuam como sinais de *feedback* negativo para manter a homeostasia.

- Resistência à morte celular programada (apoptose): A capacidade de expansão das células tumorais depende da razão entre a taxa de proliferação e a taxa de apoptose. Assim sendo, as células tumorais não adquirem apenas uma maior capacidade proliferativa, mas adquirem também uma resistência intrínseca à morte celular para limitar ou evitar a apoptose. De forma alternativa, os tumores podem alcançar os mesmos fins através do aumento da expressão de reguladores anti-apoptóticos (como o gene *BCL-2*), de sinais de sobrevivência (*IGF1/2*), ou pela diminuição da expressão de factores pró-apoptóticos (genes *BAX*, *BIM*, *PUMA*).

- Capacidade replicativa ilimitada: As células normais apresentam uma capacidade replicativa definida e controlada, devido à associação de duas barreiras para a proliferação: a senescência, que

corresponde a uma entrada da célula num estrado não-proliferativo mas viável, e a crise celular, que envolve a morte da célula. Neste sentido, é necessário que sejam inactivados mecanismos intrínsecos das células, para que as células tumorais tenham a capacidade de se multiplicar indefinidamente – imortalização - levando à expansão macroscópica do tumor. Estudos demonstram que a maioria dos tumores apresentam os mecanismos de manutenção dos telómeros activados, (normalmente com actividade enzimática da telomerase), assim como inactivação de determinados genes e vias metabólicas, como por exemplo, *TP53* e *RB/p16^{INK4a}*, sendo ambos marcos de imortalização (Reddel, 1999).

- Indução da angiogénese: Para haver uma expansão tumoral é necessário que haja uma rede de vasos sanguíneos que assegure as necessidades metabólicas destas células. As células tumorais adquirem a capacidade de induzir a formação de vasos sanguíneos (processo designado por angiogénese), de forma a sobreviverem. Nas células tumorais, a expressão do gene *VEGF-A*, responsável pela codificação de ligandos envolvidos na indução da formação de novos vasos sanguíneos, durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal, pode ser estimulada tanto por hipoxia como pela sinalização promovida por oncogenes.

- Capacidade de invasão dos tecidos e metastização: No desenvolvimento da maioria dos cancros, as células do tumor primário adquirem a capacidade de invadir outros tecidos, localmente e/ou metastizando. A invasão deve-se, em parte, à activação constitutiva ou transitória de um programa celular designado por transição epitélio-mesenquimatosa (EMT - *Epithelial-Mesenchymal Transition*), no qual células epiteliais se transformam progressivamente em células mesenquimatosas. Durante a EMT ocorre a supressão da expressão da E-caderina e o aumento da expressão de proteínas, como a vimentina e a miosina, o que potencia a capacidade invasiva e metastática dos tumores. Deste modo, este mecanismo está envolvido na aquisição de motilidade e de propriedades invasivas e metastáticas.

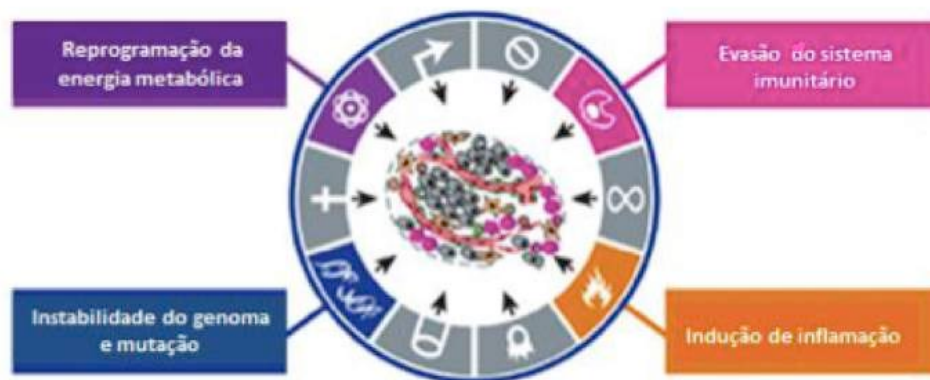


Figura I-3 - Diagrama esquemático das novas capacidades necessárias para a progressão tumoral (adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011).

- Instabilidade genómica e mutação: Algumas características referidas anteriormente podem ser adquiridas pelas células tumorais a partir de uma sucessão de alterações que ocorrem nos seus genomas. A capacidade que determinados genes apresentam para detecção e correcção de defeitos de DNA permite que a frequência de mutações espontâneas seja reduzida durante cada geração

celular. Contudo, no processo de tumorigênese, a aquisição de mutações em diferentes genes ocorre com uma frequência mais elevada. Um dos genes mais importantes a nível dos sistemas de reparação do DNA, e que se encontra alterado com maior frequência em cancro, é o gene supressor de tumor *TP53*. Este gene, em resposta aos danos no DNA, estimula a paragem do ciclo celular ou a apoptose.

- Indução de inflamação: Em condições de inflamação, o microambiente adequado para o desenvolvimento tumoral é favorecido, uma vez que são produzidos factores de crescimento e de sobrevivência que limitam a morte celular, enzimas que facilitam a angiogénese, invasão e metastização a partir da modificação da matriz extracelular, e sinais que conduzem à activação da EMT.

- Reprogramação da energia metabólica: Uma das características essenciais do desenvolvimento tumoral é a proliferação celular descontrolada, sendo necessário um ajuste do metabolismo energético para a sustentação do crescimento e divisão celular. Este metabolismo pode ocorrer: em condições aeróbias, onde as células normais processam a glucose, primeiro para piruvato, via glicólise no citoplasma e depois para dióxido de carbono na mitocôndria ou então em condições anaeróbias, em que a glicólise é favorecida e pouco piruvato é transferido para a mitocôndria. Verificou-se também que as células tumorais, na presença de oxigénio, podem realizar a glicólise, processo que passou a ser designado por “glicólise aeróbica”. Esta alteração do metabolismo deve-se principalmente ao aumento da expressão de proteínas da via da glicólise e de inibidores do metabolismo mitocondrial (Tennant *et al.*, 2010).

- Evasão do sistema imunitário: O sistema imunitário tem como função a monitorização e vigilância das células e tecidos, desempenhando funções que permitem a resistência e erradicação de grande parte das células tumorais, designada de imunidade anti-tumoral. Desta forma, para que um tumor para se propague, necessita de mecanismos que bloqueiem esta imunidade, como por exemplo, adquirir a capacidade de desactivar componentes do sistema imunológico. Um modelo proposto recentemente sugere que esta evasão ao sistema imune resulta da selecção de variantes tumorais que são resistentes à sua acção (Dunn *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2007).

2 Embriogénese, anatomia e função da glândula tiroideia

O desenvolvimento da glândula tiroideia começa na terceira semana de gestação e termina na sétima semana. Na terceira semana de gestação, a estrutura primordial da glândula tiroideia desenvolve-se a partir da proliferação epitelial na membrana da faringe primitiva, ocorrendo uma invaginação da endoderme na mesma (Sadler e Langman, 2006). Este ponto de origem da glândula tiroideia é designado por *foramen cecum* e durante a quarta semana até à sétima semana de gestação, este tecido primitivo da tiróide desce do osso hióide e cartilagens da faringe para chegar à sua posição final pré-traqueal adulta (Hoyes e Kershaw, 1985; Fancy *et al.*, 2010).

Relativamente à anatomia da glândula da tiroideia, esta glândula endócrina localiza-se na região cervical junto à traqueia e é composta por dois lobos laterais unidos por um istmo (Figural-4) (Hoyes e Kershaw, 1985). Em média, a glândula tiroideia pesa cerca de 15-25 gramas (g) nos adultos, contudo, o tamanho e aparência podem variar consoante o sexo, com a sua actividade funcional, o seu estado hormonal e com a incorporação de iodo (Muro-Cacho e Ku, 2000).

Existem duas populações de células com maior importância na glândula tiroideia: as células foliculares e as células parafoliculares (células C) (Muro-Cacho e K. Ku, 2000). As células foliculares, que são o tipo celular mais abundante, são responsáveis pela formação de uma monocamada que reveste os folículos, sendo responsáveis pelo armazenamento de iodo e síntese de hormonas tiroideias (Muro-Cacho e Ku, 2000; Kondo *et al.*, 2006), enquanto que as células parafoliculares, que se encontram entre os folículos da tiróide, têm a função de produzir e secretar calcitonina, hormona responsável pela manutenção dos níveis de cálcio no sangue (Kondo *et al.*, 2006).

As principais hormonas sintetizadas pelas células foliculares, também designadas por hormonas tiroideias, são a triiodotironina (ou T_3 , uma vez que é composta por 3 átomos de iodo) e a tiroxina (ou T_4 , por ser composta por 4 átomos de iodo), sob o controlo do eixo hipotálamo-hipófise (Kondo *et al.*, 2006; Stathatos, 2012). Um dos mais importantes reguladores da função da tiróide é a hormona TSH (*Thyroid-Stimulating Hormone*) produzida pela hipófise anterior, que é libertada pela influência das hormonas TRH (*Thyrotropin Releasing Hormone*) e das hormonas tiroideias, neste caso, por *feedback* negativo (Figura I-5) (Kondo *et al.*, 2006; Stathatos, 2012). As hormonas tiroideias têm um efeito inibitório directo na produção da hormona TRH. Contrariamente, baixos níveis destas hormonas leva a um aumento da síntese de TRH no hipotálamo, estímulo da produção de TSH na hipófise e, consequentemente, estímulo da síntese e secreção das hormonas tiroideias pelas células foliculares.

As hormonas tiroideias desempenham um papel importante no metabolismo, crescimento, na maturação de diferentes sistemas de órgãos, assim como no sistema cardiovascular, reprodutivo e

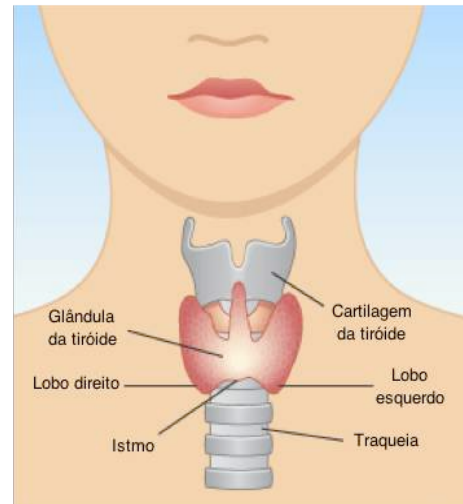


Figura I-4—Localização anatómica da glândula tiroideia. (adaptado de www.abc.net.au/health/library/stories/2005/06/16/1831822.htm).

sistema nervoso central (Gomberg-Maitland e Frishman, 1998; Spitzweg e Morris, 2002; Krassas *et al.*, 2010).

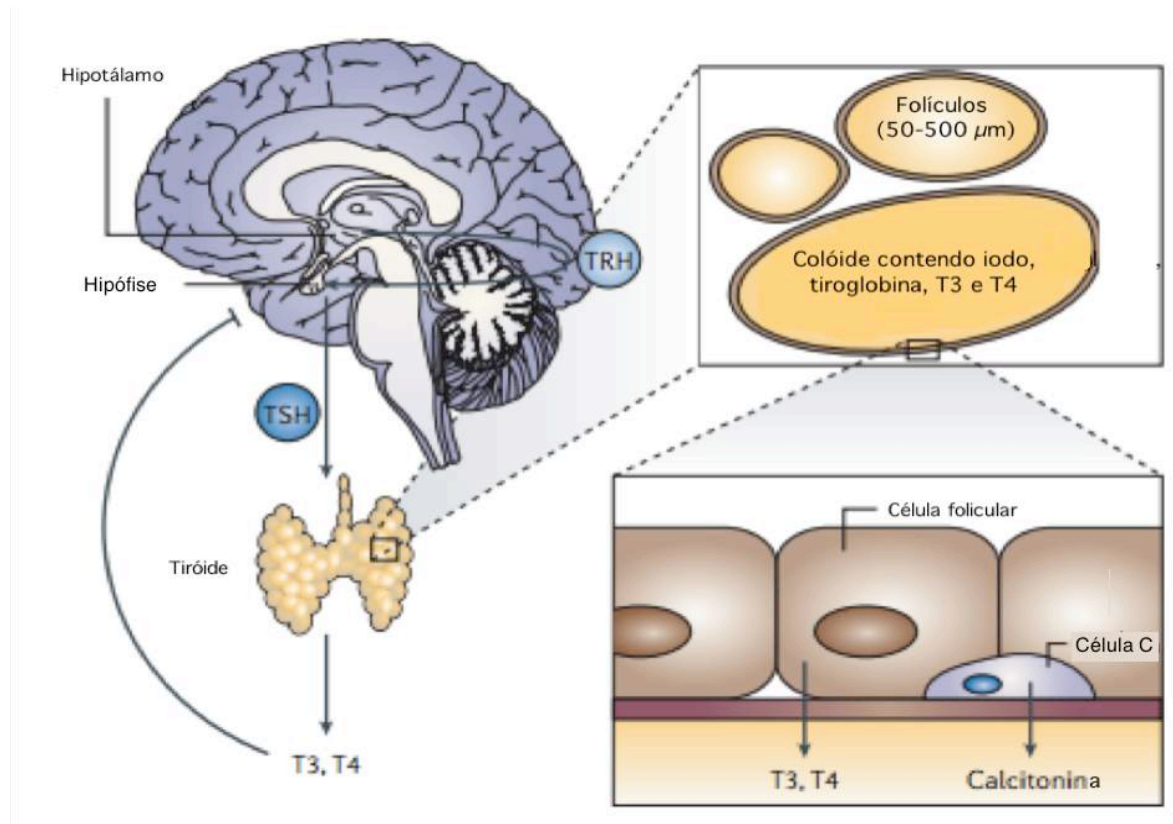


Figura I-5 – Regulação hormonal dos eixos hipotálamo-hipófise-tiróide (adaptado de Kondo *et al.*, 2006).

O iodo é absorvido da circulação pela glândula tiroideia e fígado. Um corpo de um indivíduo saudável contém cerca de 15 a 20 miligramas (mg) de iodo e 70-80% encontra-se na glândula tiroideia para formar as hormonas tiroideias (Spitzweg e Morris, 2002; Chung, 2014). Na membrana basolateral das células foliculares da tiróide, um transportador específico de iodo sódio-dependente (NIS – *Sodium Iodide Symporter*) permite que a absorção de iodo para a glândula tiroideia ocorra, a partir do plasma, por transporte activo (Spitzweg e Morris, 2002; Chung, 2014).

3 Neoplasias da tiróide

Os tumores da tiróide são as neoplasias mais frequentes do sistema endócrino e a sua incidência tem aumentado continuamente durante as últimas três décadas em todo o mundo (Curado *et al.*, 2007). Contudo, este aumento da taxa de incidência deve-se principalmente ao desenvolvimento das técnicas de diagnóstico, como por exemplo, ecografia e biopsias aspirativas por agulha fina (Figge, 2006; Morris *et al.*, 2013).

Apesar destes tumores serem aqueles em que mais aumentou a incidência nas últimas décadas, a incidência mundial do cancro da tiróide ainda é relativamente baixa e afecta com maior frequência indivíduos com idade superior aos 45 anos (Ito *et al.*, 2013). O cancro da tiróide é três a cinco vezes

mais frequente em mulheres do que nos homens, e a incidência também é maior nas mulheres. A razão para esta diferença é desconhecida, mas um aumento da prevalência de doenças da tiróide em mulheres e uma diminuição da diferença de prevalência entre os sexos após o início da menopausa sugerem um papel fundamental para os estrogénios, tanto directa como indirectamente, através do aumento dos níveis de TSH (Ito *et al.*, 2013). Determinados factores são assim essenciais para o desenvolvimento de carcinomas da tiróide, como por exemplo, a idade, factores hormonais, genéticos e ambientais (Figge, 2006). Os factores ambientais incluem: a) os efeitos genotóxicos do iodo radioativo, isto é, efeitos que conduzem a danos no DNA, uma vez que a tiróide é dependente do iodo obtido a partir do ambiente, e b) os efeitos não-genotóxicos, resultantes da deficiência em iodo (DeLellis *et al.*, 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, os tumores da tiróide podem ser divididos em tumores primários, secundários ou metastáticos, sendo os metastáticos mais raros (Nikiforov e Ohori, 2009). A maioria dos tumores primários são tumores epiteliais formados a partir de células foliculares da tiróide, designados por carcinomas não-medulares (NMTC - *Nonmedullary Thyroid Carcinoma*) (Nikiforov e Ohori, 2009; Nikiforov e Nikiforova, 2011). Este tipo de tumores engloba os tipos mais comuns de neoplasias da tiróide, tais como, os adenomas foliculares benignos (FTA – *Follicular Thyroid Adenoma*), carcinomas foliculares (FTC – *Follicular Thyroid Carcinoma*) e carcinomas papilares (PTC – *Papillary Thyroid Carcinoma*) da tiróide. Os FTC e PTC fazem parte do grupo dos carcinomas bem-diferenciados da tiróide (WDTC – *Well Differentiated Thyroid Carcinoma*). Os carcinomas pouco diferenciados (PDTC – *Poorly Differentiated Thyroid Carcinoma*) e anaplásicos (ATC – *Anaplastic Thyroid Carcinoma*) também têm origem a partir das células foliculares. Diferentes estudos apontam para que PDTC e ATC resultem da desdiferenciação de carcinomas foliculares ou papilares (bem diferenciados), existindo também a possibilidade de surgirem *de novo* (Nikiforov e Ohori, 2009; Nikiforov e Nikiforova, 2011) (Figura I-6 e Tabela I).

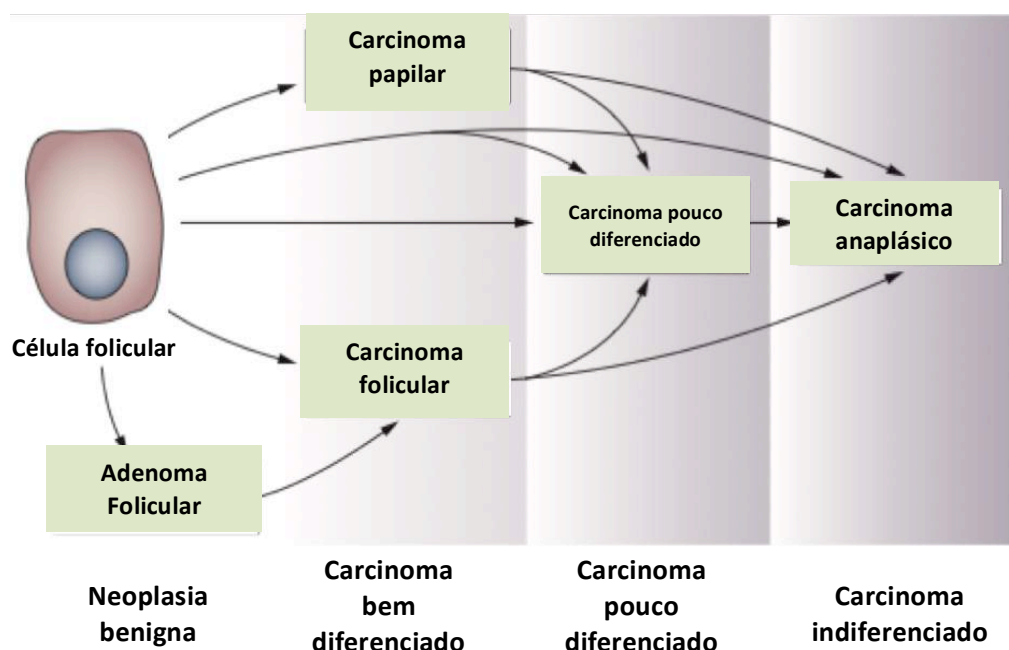


Figura I-6 – Esquema da progressão e desdiferenciação das células foliculares derivadas do cancro da tiróide (adaptado de Nikiforov e Nikiforova, 2011).

Tabela I – Esquema representativo dos diferentes tipos de tumores da glândula tiroideia

Neoplasias da Tiróide				
Origem Folicular				Origem Parafolicular
Carcinomas Não-Medulares (NMTC)			Tumores benignos	Carcinomas Medulares (MTC)
Carcinomas bem-diferenciados (WDTC): Carcinoma Papilar (PTC) Carcinoma Folicular (FTC)	Carcinomas Pouco Diferenciados (PDTC)	Carcinomas Anaplásicos (ATC)	Adenomas Foliculares (FTA)	

O segundo grupo de neoplasias que ocorrem na glândula tiroideia e que representa uma minoria dos tumores, designam-se por carcinomas medulares da tiróide (MTC – *MedullaryThyroid Carcinoma*) e têm origem a partir das células parafoliculares da tiróide (Muro-Cacho e K. Ku, 2000) (Tabela I).

3.1 Carcinomas medulares da tiróide (MTC)

O carcinoma medular da tiróide é um tumor maligno que tem origem a partir das células parafoliculares da tiróide e que representa menos de 10% das neoplasias da tiróide (Tabela II) (DeLellis *et al.*, 2004; Pacini *et al.*, 2010). Macroscopicamente, os MTC apresentam uma consistência firme, com uma cor branco-avermelhada e são bem delineados (DeLellis *et al.*, 2004; Pacini *et al.*, 2010). Os MTC tendem a metastizar precocemente para os gânglios linfáticos e para o fígado, pulmões e ossos (Pacini *et al.*, 2010).

A maioria dos MTC são esporádicos, contudo, 20 a 30% dos casos surgem no contexto de uma síndrome hereditária, sendo o modo de transmissão autossómico dominante (DeLellis *et al.*, 2004; Pacini *et al.*, 2010). Esta forma hereditária está habitualmente associada a neoplasias endócrinas múltiplas (síndrome MEN 2 - *Multiple Endocrine Neoplasia type 2*). A síndrome MEN2 é caracterizada pela combinação de MTC com feocromocitomas e/ou tumores da paratiróide (hiperparatiroidismo) (MEN 2A), ou de MTC com feocromocitomas, neuromas múltiplos das mucosas e hábito marfanóide (MEN 2B). Os carcinomas medulares da tiróide familiares também podem surgir isoladamente na ausência de outras neoplasias (FMTC – *Familial Medullary Thyroid Carcinoma*) (Pacini *et al.*, 2010). A síndrome MEN 2A, MEN 2B e o FMTC resultam de mutações germinais que levam a um ganho-de-função do proto-oncogene *RET* (*REarranged during Transfection*) (Pacini *et al.*, 2010).

Os casos esporádicos de MTC representam 70 a 80% de todas as neoplasias medulares da tiróide (DeLellis *et al.*, 2004). Mutações somáticas no codão 918 do proto-oncogene *RET* foram identificadas em 25-33% nos tumores de doentes com MTC esporádico (Pacini *et al.*, 2010), assim

como no estudo realizado pelo nosso grupo, mutações somáticas no mesmo gene foram detectadas em 64,7% dos tumores de doentes com MTC esporádico (Moura *et al.*, 2009). O nosso grupo também identificou mutações no gene *RAS* em 68% dos casos esporádicos negativos para mutações no gene *RET*, e em apenas 2,5% dos casos esporádicos positivos para mutações no gene *RET*, sugerindo que a activação dos proto-oncogenes *RAS* e *RET* representam eventos genéticos alternativos para a tumorigénese dos MTC esporádicos (Moura *et al.*, 2011).

3.2 Adenomas foliculares da tiróide (FTA)

O adenoma folicular é um tumor benigno homogéneo, redondo ou com uma estrutura oval, na glândula tiroideia, que se encontra coberto por uma fina cápsula fibrosa (DeLellis *et al.*, 2004; McHenry e Phitayakorn, 2011).

Os factores envolvidos no desenvolvimento dos adenomas foliculares são os mesmos que estão envolvidos no desenvolvimento de carcinomas foliculares, como por exemplo, deficiência de iodo, radiação e desenvolvimento de bócio endémico (DeLellis *et al.*, 2004; McHenry e Phitayakorn, 2011).

A nível genético, foram identificados rearranjos *PAX8-PPAR γ* (*PAX8* – *Paired Box 8*; *PPAR γ* – *Peroxisome Proliferation-Activated Receptor type γ*) em cerca de 4-33% dos adenomas foliculares (Marques *et al.*, 2002; Castro P. *et al.*, 2006; McHenry e Phitayakorn, 2011). *PAX8* é um gene que codifica uma proteína nuclear, que é um factor de transcrição específico da tiróide, e que está envolvido na diferenciação das células foliculares. A proteína de fusão *PAX8-PPAR γ* poderá ter uma função oncogénica, dado que suprime a actividade *wild type* do gene *PPAR γ* , que tem a capacidade de inibir a proliferação e promover a diferenciação das células tumorais (Marques *et al.*, 2002).

Um estudo demonstrou que *PAX8-PPAR γ* aumenta a viabilidade das células da tiróide e causa efeitos opostos na expressão de genes específicos da tiróide, sugerindo que este rearranjo possa contribuir para a transformação maligna de células foliculares da tiróide (Espadinha *et al.*, 2007).

Diversos estudos demonstram que a ocorrência de mutações no gene *RAS* (*Rat sarcoma vírus homolog*) em adenomas foliculares é bastante frequente (23%-48%) (Figura I-7) (Nikiforova *et al.*, 2003; Castro P *et al.*, 2006; Jeong *et al.*, 2015).

3.3 Carcinomas não-medulares da tiróide (NMTC)

Os carcinomas não medulares da tiróide têm origem nas células foliculares e representam aproximadamente 90% dos tumores da tiróide (DeLellis, 2006).

3.3.1 Carcinomas Papilares (PTC)

Os carcinomas papilares da tiróide são os carcinomas mais comuns da glândula tiroideia, representando aproximadamente 80% dos carcinomas da tiróide em adultos (Tabela II) (Erickson, 2014). Os doentes com PTC apresentam uma faixa etária entre os 20 e os 50 anos de idade, com uma razão de mulheres:homens afectados de 4:1 (Erickson, 2014). Apesar dos PTC serem a neoplasia mais comum da tiróide, apresentam um excelente prognóstico e a taxa de sobrevivência destes doentes é aproximadamente de 90% (Caron, 2006).

A maioria dos PTC possui uma cor cinzento-esbranquiçada e limites irregulares, podendo o seu tamanho variar entre menos de 1 centímetro até vários centímetros (DeLellis *et al.*, 2004). Os núcleos dos PTC apresentam inúmeros alterações, tais como, alargamento, forma oval, sulcos e pseudoinclusões (DeLellis *et al.*, 2004).

Existem diversas variantes de neoplasias papilares da tiróide, sendo importante descrever histologicamente estas variantes para definição do prognóstico e associação com outras doenças (Erickson, 2014).

Os PTC apresentam diferentes tipos de alterações, incluindo rearranjos e mutações pontuais, (DeLellis, 2006). Cerca de 60% dos casos de PTC apresentam mutações no gene *BRAF* (*Murine sarcoma viral (v-raf) oncogene homolog B1*), e 20-30% dos casos de PTC em adultos apresentam rearranjos *RET/PTC* (Figura I-7) (Erickson, 2014). Em geral, os rearranjos encontram-se relacionados com a exposição a radiação, enquanto que a origem das mutações pontuais, como por exemplo, no gene *RAS*, que ocorre com baixa frequência em carcinomas papilares da tiróide, permanece ainda desconhecida (DeLellis, 2006). Os rearranjos *RET/PTC1* são mais comuns em microcarcinomas (microPTC) e em tumores papilares clássicos (cPTC) (DeLellis *et al.*, 2004; Erickson, 2014). Uma característica comum às alterações nos genes *RET*, *TRK* (*Tropomyosin-Related Protein*), *BRAF* e *RAS* é o facto destes genes pertencerem à via MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) que está envolvida na sinalização de uma variedade de factores de crescimento e de receptores de superfície celular (DeLellis, 2006).

3.3.2 Carcinomas Foliculares (FTC)

Os carcinomas foliculares são tumores epiteliais que apresentam evidências de diferenciação das células foliculares, mas sem as características nucleares dos carcinomas papilares (DeLellis *et al.*, 2004). Os FTC apresentam uma prevalência de 10-15% (Tabela II) e a incidência dos FTC é maior em áreas com deficiência de iodo e em indivíduos expostos a radiação (DeLellis *et al.*, 2004).

A maioria dos FTC são tumores sólidos encapsulados, com uma cor castanho-acinzentado na superfície e com dimensões normalmente superiores a 1 cm de diâmetro (DeLellis *et al.*, 2004; Sobrinho-Simões *et al.*, 2011).

Os FTC ocorrem normalmente como tumores únicos. A sua disseminação através da corrente sanguínea para os pulmões e ossos é um processo bastante comum (Sobrinho-Simões *et al.*, 2011).

De acordo com as suas propriedades de invasão, os FTC podem ser classificados em duas categorias (DeLellis, 2006; Sobrinho-Simões *et al.*, 2011): a) os FTC com invasão mínima, que são tumores com invasão transcapsular e/ou invasão capsular limitada, com risco de recorrência ou de metastização mínimo (DeLellis, 2006); b) os FTC com invasão extensa, que são tumores com evidências de invasão capsular e/ou vascular e que estão associados a morbilidade e mortalidade elevadas (DeLellis, 2006). Recentemente, foi criada uma nova classificação de carcinomas foliculares, designados por carcinomas angioinvasivos, com o intuito de facilitar o prognóstico e terapêutica deste tipo de carcinomas (Sobrinho-Simões *et al.*, 2011).

Uma outra variante de FTC são os tumores oncocíticos (oncFTC). Tal como os FTC convencionais, estes tumores podem ser subdivididos em FTC oncocíticos de invasão mínima ou de

invasão extensa (DeLellis, 2006). As células foliculares desta variante de FTC são designadas por células Hürthle, as quais apresentam diversas alterações, tais como grandes deleções no DNA mitocondrial, mutações nos genes mitocondriais *OXPPOS* e mutações no DNA que codifica para proteínas mitocondriais (Sobrinho-Simões *et al.*, 2011).

Estudos sobre os carcinomas foliculares da tiróide identificaram o oncogene de fusão *PAX8-PPAR γ* , assim como o envolvimento da proteína de fusão PPFP (*PAX8/PPAR γ protein fusion*) na patogenicidade dos FTC (Marques *et al.*, 2002; Eberhardt, 2010). Outras evidências demonstram que mutações no gene *RAS* são detectadas em cerca de 40% dos casos de FTC e que a activação da via PTEN/PI3K/AKT está frequentemente envolvida no desenvolvimento destes tumores (Figura I-7) (Howell *et al.*, 2013). Contudo, a co-expressão das mutações do gene *RAS* com a proteína PPFP é raramente detectada em FTC (Eberhardt, 2010).

3.3.3 Carcinomas Pouco Diferenciados (PDTC)

Os carcinomas pouco diferenciados são tumores malignos raros que têm como origem nas células foliculares e são caracterizados pela perda parcial da diferenciação das células tiroideias (Nikiforov *et al.*, 2012). Este tipo de carcinomas apresentam uma prevalência reduzida, representando menos de 10% dos casos de NMTC (Tabela II), sendo mais afectadas as pessoas idosas, com idades compreendidas entre os 55 e 65 anos (Nikiforov *et al.*, 2012).

Quanto às características morfológicas dos PDTC, estes tumores normalmente apresentam-se como massas sólidas de cor cinzento-esbranquiçada, com dimensões superiores a 3 centímetros de diâmetro (DeLellis *et al.*, 2004). Os PDTC podem manifestar diversos padrões de crescimento, tais como insular, trabecular ou sólido, e apresentam propriedades mitóticas significativas, invasão capsular, vascular e necrose (DeLellis, 2006). Os modelos de progressão tumoral apresentados por diferentes autores sugerem que alguns PDTC desenvolvem-se a partir de tumores da tiróide bem-diferenciados (PTC ou FTC) pré-existent, enquanto outros se desenvolvem *de novo* (Pita *et al.*, 2009; Nikiforov *et al.*, 2012). Os PDTC disseminam-se frequentemente para gânglios linfáticos e metastizam para o fígado e ossos (DeLellis *et al.*, 2004).

As mutações somáticas que ocorrem nos PDTC podem ser divididas em 2 grupos: (1) mutações nos genes *BRAF* e *RAS* que ocorrem em tumores bem-diferenciados, iniciando a tumorigénese e predispondo os tumores para eventos moleculares subsequentes que levam à sua desdiferenciação (Nikiforov *et al.*, 2012); (2) mutações que estão presentes apenas em PDTC e são eventos tardios, que conduzem directamente ao processo de desdiferenciação, incluindo mutações nos genes *TP53* (Nikiforov *et al.*, 2012). Um estudo recente demonstrou que as mutações no gene *RAS* ocorrem em cerca de 18% dos PDTC, enquanto que as mutações no gene *TP53* ocorrem em 27% dos casos de PDTC, respectivamente (Pita *et al.*, 2014).

3.3.4 Carcinomas Anaplásicos (ATC)

Os carcinomas anaplásicos da tiróide são definidos como neoplasias constituídas parcial ou totalmente por células indiferenciadas (DeLellis, 2006).

Os ATC são as neoplasias mais agressivas da tiróide e apesar de representarem menos de 5% de todas as neoplasias desta glândula (Tabela II), a taxa de mortalidade é superior a 90% com uma média de sobrevivência de 6 meses após o diagnóstico (DeLellis *et al.*, 2004).

Em termos epidemiológicos, verifica-se que o rácio de incidência mulher:homem deste tipo de tumor é de 5 para 1, e que a maioria dos doentes apresentam idades superiores aos 55 anos (Taccaliti *et al.*, 2012).

A nível morfológico, os ATC apresentam-se como uma massa branca cervical, que se encontra em rápida expansão e exibem áreas de necrose, hemorragia e invasão muscular. A dimensão da massa tumoral pode variar entre os 3 a 20 centímetros e a nível microscópico, estes tumores são caracterizados pela presença de células escamosas, epitelióides e fusiformes, ocorrendo frequentemente misturas deste tipos de células nos tumores individuais (DeLellis, 2006). Os ATC podem ser fixos e duros, em 75% dos casos, podendo estar presente como nódulo simples (60%) ou múltiplos nódulos (40%), ou então, com envolvimento bilateral (25% dos casos) (DeLellis *et al.*, 2004).

Cerca de 20-50% dos doentes com ATC apresentam metástases maioritariamente nos pulmões, e 25% desenvolvem novas metástases, nos ossos e cérebro (Taccaliti *et al.*, 2012). A metastização local para gânglios também é observada em 40% dos doentes com ATC (Taccaliti *et al.*, 2012).

Avanços no estudo dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento dos ATC poderão contribuir para o desenvolvimento de terapias direccionadas a alvos moleculares. Parte dos ATC apresentam mutações em genes envolvidos nos PTC e FTC (eg. genes *RAS* e *BRAF*), sugerindo que estes carcinomas anaplásicos se desenvolvem a partir de tumores pré-existent, bem diferenciados ou pouco-diferenciados, por um processo de desdiferenciação, podendo adquirir novas mutações, por exemplo nos genes *TP53*, *PTEN*, *CTNNB1* e *PIK3CA* (Figura I-7). Alternativamente, tem sido sugerido que alguns ATC poderão desenvolver-se a partir de mutações *de novo* (Taccaliti *et al.*, 2012). Alterações genéticas no gene *TP53* são as mais frequentes em carcinomas anaplásicos (42-55%), enquanto que as outras mutações seguem a frequência indicada: *RAS* (22-31%), *BRAF* (8-26%), *CTNNB1* (0-38%), *PIK3CA* (4-17%), *PTEN* (10%) e *CDKN1* (*cyclin-dependent kinase inhibitors*) (10-14%) (Taccaliti *et al.*, 2012; Pita *et al.*, 2014). Num estudo recente realizado pelo nosso grupo, em 48 tumores (26 ATCs e 22 PDCs) analisados, 17 com mutações no gene *TP53* e 12 com mutações no gene *RAS*, apenas um ATC apresentava mutação nestes dois genes, em co-existência, sugerindo que estes eventos são mutuamente exclusivos (Pita *et al.*, 2014).

Tabela II – Tumores da tiróide e suas características (adaptado de Xing, 2013).

Tipo de tumor	Células de origem	Prevalência (% dos cancros da tiróide)	Características
FTA	Células foliculares da tiróide	Lesão benigna	<ul style="list-style-type: none"> Tumor da tiróide benigno; Estrutura semelhante aos FTC, mas tipicamente encapsulado; Ausência de capacidade de invasão capsular ou vascular; Reduzida capacidade de metastização.

PTC	Células foliculares da tiróide	80-85	<ul style="list-style-type: none"> Bem diferenciado; Núcleo com diversas características, tais como, alargamento, forma oval, alongação e inclusões; Propensão para metástases ganglionares; Subtipos de PTC incluem PTC convencional (cPTC), variante PTC folicular (fvPTC) e também algumas variantes raras.
FTC	Células foliculares da tiróide	10-15	<ul style="list-style-type: none"> Bem diferenciado; Hipercelular; Ausência das características nucleares dos PTC; Invasão vascular ou capsular; Propensão para metastizar por via hematogénea; Células Hürthle (único subtipo de FCT).
PDTC	Células foliculares da tiróide	5-10	<ul style="list-style-type: none"> Pouco diferenciado; Com agressividade intermédia entre os carcinomas da tiróide bem diferenciados e indiferenciados.
ATC	Células foliculares da tiróide	2-3	<ul style="list-style-type: none"> Indiferenciado; Mistura de células pleomórficas e células epitelióides; Extremamente invasivo e metastático; Letal na maioria dos casos; Pode ocorrer <i>de novo</i> ou a partir dos PTC, FTC ou PDTC.
MTC	Células parafofoliculares da tiróide	2-3	<ul style="list-style-type: none"> Moderadamente agressivo; Propensão para metástases ganglionares; Ocorrência em formas familiares (síndrome MEN2) ou esporádicas

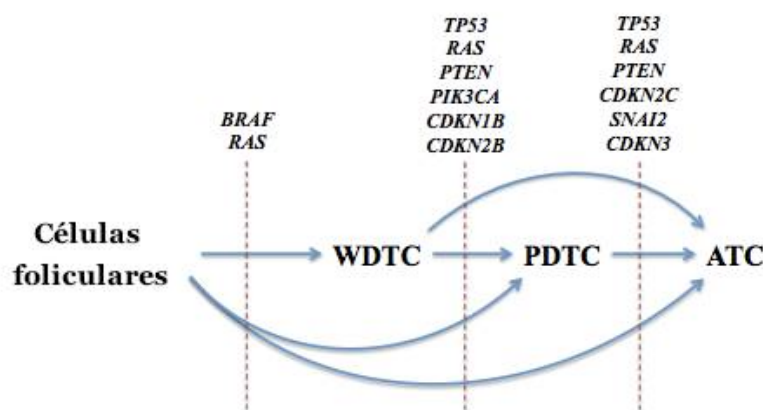


Figura I-7 – Alterações moleculares envolvidas no desenvolvimento dos ATC e PDTC (adaptado de Pita *et al.* 2014).

4 Formas familiares de carcinomas não-medulares da tiróide (FNMTC)

4.1 Aspectos clínicos do FNMTC

Os carcinomas da tiróide são maioritariamente esporádicos (aproximadamente 90-95% dos casos), mas também podem estar associados a uma predisposição familiar (5-10% dos casos). As formas familiares são identificadas quando, pelo menos dois familiares em 1º grau apresentam carcinomas da tiróide (LiVolsi e Baloch, 2009). Estes casos familiares podem ser divididos em duas categorias (LiVolsi e Baloch, 2009). A primeira categoria corresponde às formas familiares de NMTC (FNMTC – *Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma*) em que a lesão principal é o tumor da tiróide e representa cerca de 3 a 7% de todos os casos de carcinomas não-medulares (Bonora *et al*, 2010). Esta associação familiar é mais frequente em casos com PTC, embora seja também ocasionalmente reportada em casos com FTC. Estas evidências para a existência de FNMTC provêm de investigações epidemiológicas, de estudos de grandes famílias com NMTC e de estudos genéticos de *linkage* nessas famílias (Malchoff e Malchoff, 2006). A segunda categoria corresponde às formas familiares com manifestação de lesões tiroideias associadas a neoplasias hereditárias extratiroideias (Malchoff e Malchoff, 2006). Este grupo inclui a síndrome de Cowden, a síndrome de Gardner (polipose adenomatosa familiar, FAP), o complexo de Carney e a síndrome de Werner (LiVolsi e Baloch, 2009; Moses *et al.*, 2011).

O padrão de transmissão do FNMTC é autossómico dominante, com penetrância incompleta que aumenta com a idade (Malchoff e Malchoff, 2006). Os membros de famílias com FNMTC também podem apresentar nódulos benignos da tiróide, incluindo adenomas foliculares, bócio multinodular e difuso e tiroidite auto-imune (Bonora *et al*, 2010). Os tumores dos casos com FNMTC apresentam características que são também comuns a outros tumores associados a síndromes neoplásicas hereditárias, tais como a manifestação em idades mais precoces e multifocalidade (LiVolsi e Baloch, 2009).

Além destas características, alguns estudos sugerem que os doentes com NMTC familiar quando comparados com as formas esporádicas, podem apresentar tumores mais agressivos, em idades mais precoces, apresentando com maior frequência bilateralidade, metastização para os gânglios linfáticos e invasão da cápsula (Malchoff e Malchoff, 2006; LiVolsi e Baloch, 2009; Bonora *et al*, 2010; Moses *et al.*, 2011). Contrariamente, estudos realizados por outros autores sugerem que as formas familiares de NMTC e as esporádicas aparentam ter um comportamento clínico semelhante, não estando o PTC familiar associado a um pior prognóstico (Moses *et al.*, 2011; Pinto *et al.*, 2013).

4.2 *Loc*i de susceptibilidade para o FNMTC

A base genética do FNMTC permanece ainda pouco conhecida (Tabela III). Com o avanço das novas tecnologias na área da genética molecular, têm sido identificados diversos *loci* de susceptibilidade para o FNMTC, a partir de análises de *linkage* que abrangem todo o genoma humano, em famílias informativas com múltiplos familiares afectados (Bonora *et al*, 2010). O estudo de diferentes miRNAs e do efeito do tamanho dos telómeros e da actividade da telomerase na

predisposição genética para o FNMTTC tem sido também investigado nos últimos anos (Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

4.2.1 **Locus MNG1**

O primeiro *locus* identificado como potencialmente implicado em FNMTTC foi o *MNG1* (*Multinodular Goiter 1*), a partir do estudo de uma família com 18 casos de bócio multinodular (MNG), dos quais dois também apresentavam PTC (Bignell *et al.*, 1997). O modo de transmissão nesta família era autossômico dominante. Após a genotipagem de 34 indivíduos, numa análise de *linkage* que envolveu todo o genoma, o *locus* de susceptibilidade foi mapeado na região cromossômica 14q31 (Bignell *et al.*, 1997). Em 2011, foi identificado um gene de susceptibilidade para o FNMTTC neste *locus*, o gene *DICER1* (Frio *et al.*, 2011). No entanto, o estudo de famílias com FNMTTC indicou que apenas aquela que tinha sido estudada inicialmente (Bignell *et al.*, 1997) apresentava mutação neste gene (Frio *et al.*, 2011). Foram no entanto detectadas mutações no gene *DICER1* em famílias com FMNG (ver ponto 5).

4.2.2 **Locus TCO**

O *locus TCO* (*Thyroid Carcinoma With Cell Oxyphilia*) foi mapeado pela primeira vez na região cromossômica 19p13.2 numa família Francesa com seis casos de MNG e três casos com carcinomas de células Hürtle, de acordo com o Consórcio Francês de NMTC (Canzian *et al.*, 1998). Os tumores oxifílicos, também conhecidos como tumores oncocíticos, e na glândula tiroideia como tumores de células de Hürthle, são constituídos por células repletas de mitocôndrias (Bonora *et al.*, 2010).

Inicialmente foi especulado que o *locus TCO* estaria associado apenas a uma única forma de FNMTTC com células Hürthle. Contudo, a análise de *linkage* de famílias adicionais sugeriu uma potencial interação genética entre o *locus TCO* na região 19p13.2 e o *locus NMTC1* na região 2q21 (ver ponto 4.2.4), que resulta num aumento significativo do risco de NMTC, nos casos em que a doença segrega com os dois *loci* de susceptibilidade (Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

4.2.3 **Locus fPTC/PRN**

O *locus fPTC/PRN* foi inicialmente identificado na região cromossômica 1q21 numa família Americana com cinco membros afectados com PTC, um dos quais também com cancro do cólon e dois com carcinoma papilar renal (PRN). Foram realizados estudos de *linkage*, que envolveram 31 membros desta família, e conduziram ao mapeamento do gene de susceptibilidade no cromossoma 1q21, designado por *locus fPTC/PRN* (Malchoff *et al.*, 2000).

Até à data, o envolvimento do *locus fPTC/PRN* em FNMTTC não foi confirmado por outro estudo independente (Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

4.2.4 **Locus NMTC1**

A existência de um *locus* de susceptibilidade para FNMTTC (*NMTC1*) na região cromossômica 2q21 foi inicialmente identificado a partir de estudos de *linkage* de uma grande família da Tasmânia,

que apresentava uma elevada frequência de PTC. A análise de *linkage* abrangendo todo o genoma conduziu ao mapeamento do gene de susceptibilidade no cromossoma 2q21 (McKay *et al.*, 2001).

Num outro estudo, que envolveu dez famílias com FNMTc, mostrou que 70% dessas famílias apresentavam *linkage* com os *loci* TCO e NMTC1, como foi referido no ponto 4.2.2, o que sugeriu que uma interação entre os *locus* TCO e NMTC1 poderia aumentar o risco de FNMTc (McKay *et al.*, 2004). Observou-se também a perda de heterozigotia dos *locus* TCO e NMTC1 em alguns dos tumores dos doentes com FNMTc, confirmando que alterações nestes *loci* de susceptibilidade podem ser relevantes numa fracção dos casos com FNMTc (Cavaco *et al.*, 2008; Na *et al.*, 2011).

4.2.5 Locus FTEN

Em 2008, o nosso grupo realizou o estudo de uma grande família Portuguesa, que apresentava onze membros afectados com lesões benignas da tiróide, incluindo bócios multinodulares e adenomas foliculares, e cinco doentes afectados com cancro da tiróide (Cavaco *et al.*, 2008b).

Através da análise de *linkage* global do genoma, foi identificado um novo *locus* de predisposição para o FNMTc na região cromossómica 8p23.1-p22, sendo este *locus* designado de FTEN, abrangendo uma região mínima a 7,46 Mb. A análise de mutações por sequenciação do DNA, permitiu excluir dezassete genes candidatos na região mínima. Na análise de LOH que foi realizada em 7 tumores de doentes da família, para investigar a inactivação de um possível gene supressor de tumor na região cromossómica 8p23.1-p22, não foram detectadas perdas alélicas (Cavaco *et al.*, 2008b). A partir destes estudos e por sequenciação global do exoma de um doente desta família Portuguesa, foi identificado um novo gene candidato para o FNMTc, o gene C8orf48 (Pereira, 2012). Nesta tese de Mestrado, este gene foi alvo de estudos funcionais para investigar o seu envolvimento na tumorigénese.

4.2.6 Outros loci de susceptibilidade

Uma análise por arrays de SNPs em 38 famílias com membros com FNMTc nos Estados Unidos da América e Itália identificou *linkage* em 49 parentes afectados entre o fenótipo FNMTc e as regiões cromossómicas 1q21 e 6q22 (Suh *et al.*, 2009).

Em 2009, He e os seus colaboradores identificaram na região cromossómica 8q24 um *locus* de susceptibilidade para o PTC (He *et al.*, 2009). Este *locus* foi identificado numa grande família com PTC e melanoma (He *et al.*, 2009).

4.3 miRNAs para os FNMTc

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codificantes endógenos (com aproximadamente 22 nucleótidos), conservados, de cadeia simples, que reprimem a expressão genética a nível pós-transcricional (Bartel, 2004). De acordo com a base de dados miRBase, o genoma humano codifica mais de 1500 sequências de miRNAs, que interagem com aproximadamente 60% dos genes codificantes de proteínas (Kozomara *et al.*, 2011).

Os miRNAs emparelham com a sequência complementar na região 3' não traduzida (3'UTR) de mRNAs codificantes de proteínas, levando à clivagem do mRNA ou a repressão do mecanismo de

tradução envolvido na síntese proteica. Assim, os miRNAs tanto podem inibir a tradução, como induzir a degradação do mRNA alvo, dependendo da complementaridade entre o miRNA e o local de ligação, do número de locais de ligação e da acessibilidade a esses mesmos locais. Existem duas classes de microRNAs relevantes para o cancro: os “*onco-miRs*”, envolvidos na promoção dos efeitos oncogénicos e os “*tumour-suppressive miRNAs*” que limitam a progressão do cancro (Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

Recentemente, foi realizado um estudo comparativo dos perfis dos miRNAs nos FNMTc e NMTC esporádicos. Neste estudo, a expressão de miRNAs foi analisada utilizando *microarrays*. Os autores identificaram 2 miRNAs, miR-886-3p e miR-20a, que apresentam diferentes níveis de expressão entre FNMTc e NMTC e que foram posteriormente confirmadas por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR). Este estudo revelou que o miR-886-3p actuava em genes envolvidos na replicação do DNA e regulava uma via de adesão focal, e que o aumento da expressão do miR-886-3p em linhas de cancro da tiróide inibia a proliferação e migração celular. Estes resultados sugerem que o miR-886-3p poderá ter uma importante função na biologia celular do cancro da tiróide e na regulação dos genes envolvidos na replicação do DNA e adesão focal (Xiong *et al.*, 2011).

4.4 Telómeros e telomerase nos FNMTc

Os telómeros são regiões não-codificantes na extremidade dos cromossomas de eucariotas, que consistem em centenas de cópias repetitivas de uma simples sequência - *tandem repeat* - (TTAGGG em vertebrados), que tem como principal função estabilizar o cromossoma na replicação durante a divisão celular. Os telómeros ficam progressivamente mais curtos em cada replicação celular devido à síntese incompleta da cadeia de DNA e a danos oxidativos. Quando os telómeros ficam criticamente pequenos, a célula entra em senescência ou apoptose (Ju *et al.*, 2008).

A telomerase é uma ribonucleoproteína com actividade de transcriptase reversa que promove a extensão dos telómeros, através da adição de sequências repetitivas de DNA ricas em guanina. Na ausência da telomerase, ou quando a actividade desta enzima é reduzida, as vias de sinalização que conduzem à apoptose são activadas (Gilson *et al.*, 2007).

A maioria das células morrem por apoptose quando os telómeros ficam criticamente curtos, raramente as células que sobrevivem mantêm estáveis os telómeros de curtas dimensões a partir da reactivação da telomerase, o que facilita a imortalização das células. Isto sugere que a manutenção do comprimento dos telómeros é necessária para uma continua divisão e imortalização celular. (Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

A reactivação da telomerase é um mecanismo fundamental no desenvolvimento do cancro. A actividade da telomerase (TA) pode ser considerada como um marcador tumoral. Em amostras de tiróide normal, a expressão de TA é normalmente nula, enquanto que elevados níveis de TA foram detectados em todas as histologias dos carcinomas da tiróide (papilares, foliculares, medulares e anaplásicos) (Capezzone *et al.*, 2009).

Recentemente foi detectado um aumento de alterações teloméricas, como por exemplo, associações e fusões teloméricas que originam fragilidades cromossómicas em doentes com FNMTc, comparativamente com indivíduos saudáveis e indivíduos com PTC esporádicos (Cantara *et*

al., 2012). A existência de um desequilíbrio do complexo telómero-telomerase, ou seja, de telómeros de curtas dimensões e de uma elevada actividade da telomerase foi reportada num estudo com 34 doentes com FNMTTC, validada com 18 doentes com FNMTTC e com 75 casos esporádicos de PTC. Para além deste desequilíbrio do complexo telómeros-telomerase, os autores observaram que os doentes com FNMTTC apresentavam também um aumento da amplificação do número de cópias do gene *hTERT*. Estas alterações genéticas estão associadas a uma instabilidade genómica, que permitem que as células com danos no DNA escapem da apoptose e contribuem para a imortalização celular (Capezzone *et al.*, 2008).

Estas observações sugerem que doentes que nasçam com telómeros curtos podem alcançar mais rapidamente o limite do tamanho dos telómeros, o que confere susceptibilidade para o desenvolvimento de cancro e/ou para sua progressão. Neste estudo, observou-se também que os doentes da segunda geração foram diagnosticados com cancro da tiróide numa idade mais precoce, comparativamente com os seus familiares da primeira geração (Capezzone *et al.*, 2009). Estas observações sugerem que há antecipação genética nas famílias com FNMTTC (Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

Tabela III – Loci e genes de susceptibilidade para o FNMTTC (adaptado de Navas-Carrillo *et al.*, 2014).

Loci de susceptibilidade	Localização cromossómica	Estudos	Referências
<i>MNG1</i>	14q31	Identificação do gene de susceptibilidade para o FNMTTC, <i>DICER1</i> .	Bignell <i>et al.</i> , 1997 Frio <i>et al.</i> , 2011
<i>TCO</i>	19p13.2	Confirmado em estudos independentes. Evidência de interacção genética entre <i>TCO</i> e <i>NMTC1</i> .	Canzian <i>et al.</i> , 1998
<i>fPTC/PRN</i>	1q21	<i>Locus</i> não confirmado em estudos independentes e nenhuma associação entre famílias com PTC e PRN foi reportada.	Malchoff <i>et al.</i> , 2000
<i>NMTC1</i>	2q21	Interacção entre os <i>locus TCO</i> e <i>NMTC1</i> pode aumentar o risco de FNMTTC em doentes que herdam ambos os <i>locus</i> de susceptibilidade.	McKay <i>et al.</i> , 2001
<i>FTEN</i>	8p23.1-p22	Gene associado maioritariamente a bócio multinodular, embora alguns casos apresentassem carcinomas da tiróide. Apenas uma família Portuguesa apresentou <i>linkage</i> com esta região.	Cavaco <i>et al.</i> , 2008
<i>FOXE1</i>	9q22.33	Este gene codifica um factor de transcrição da tiróide. A variante germinal neste gene p.A248G está envolvida na etiologia do FNMTTC numa família Portuguesa.	Gudmundsson <i>et al.</i> , 2009 Pereira <i>et al.</i> ,

2015			
NKX2-1	14q13.3	Este gene codifica um factor de transcrição da tiróide. A variante germinal neste gene p.A339V está envolvida em FNMTc em 20 doentes com MNG/PTC de 2 famílias.	Ngan <i>et al.</i> , 2009
Gene mapeado ainda não identificado	1q21	Análise de <i>linkage</i> envolvendo todo o genoma com <i>microarrays</i> de SNPs em de 38 famílias com FNMTc.	Suh <i>et al.</i> , 2009
Gene mapeado ainda não identificado	6q22	Análise de <i>linkage</i> envolvendo todo o genoma com <i>microarrays</i> de SNPs em de 38 famílias com FNMTc	Suh <i>et al.</i> , 2009
Gene mapeado ainda não identificado	8q24	Análise de <i>linkage</i> envolvendo todo o genoma numa família com PTC e melanoma	He <i>et al.</i> , 2009
miR-886-3p	5q31.2	Gene diferencialmente expresso em FNMTc comparativamente com NMTC, que regula a expressão de genes envolvidos na replicação do DNA e na adesão focal	Xiong <i>et al.</i> , 2011
complexo <i>TERC-hTERT</i>	3q26 e 5p15.33	Telómeros curtos e aumento do número de cópias do gene <i>hTERT</i>	Capezzone <i>et al.</i> , 2008

5 Genes candidatos para o FNMTc

Têm sido propostos diversos genes candidatos para o FNMTc, nomeadamente: o gene *PTEN*, que é responsável pela doença de Cowden, o gene *MET*, que predispõe para o carcinoma papilar renal, o proto-oncogene *RET*, que é responsável pela síndrome MEN 2A e B e MTC familiar isolado, e o gene *APC*, responsável pela polipose adenomatosa do cólon familiar (Malchoff *et al.*, 2000). Contudo, estudos de *linkage* e/ou de mutações excluíram o envolvimento destes genes na susceptibilidade para o FNMTc (Malchoff *et al.*, 2000), o que faz com que os genes *DICER1* e *SRGAP1* tenham sido os únicos até ao momento identificados como genes de susceptibilidade para o FNMTc (Frio *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013).

Em 2011, Frio e colaboradores seleccionaram 53 indivíduos de 2 famílias (sendo uma destas a família estudada por Bignell *et al.*, que levou ao mapeamento do *locus MNG1*) que apresentavam MNG e de 3 famílias que apresentavam MNG associado a tumores de células *Sertoli-Leydig* do ovário (SLCT, *Sertoli-Leydig Cell Tumors*) (Frio *et al.*, 2011). Estes investigadores identificaram e caracterizaram mutações germinais no gene *DICER1* em 37 indivíduos das 2 famílias seleccionadas, concluindo que seria esperado que as alterações no gene *DICER1* conduzissem à formação de

proteínas truncadas ou à formação de proteínas com alterações conformacionais em domínios funcionais relevantes da proteína DICER1 humana.

Uma vez que o gene *DICER1* tem um papel crucial no processamento dos miRNA, poderá estar envolvido numa fase precoce do desenvolvimento tumoral, sendo desta forma um bom candidato para futuras investigações em famílias com múltiplos casos de MNG (Frio *et al.*, 2011).

Relativamente ao gene *SRGAP1*, este gene foi identificado a partir de estudos de *linkage* realizados em 38 famílias. Duas variantes *missense* p.Q149H e A275T, localizadas no domínio homólogo Fes/CIP4 segregavam com a doença, respectivamente em duas famílias, enquanto que uma variante *missense* p.R617C, localizada no domínio RhoGAP foi detectada numa terceira família. Ensaio bioquímicos demonstraram que as variantes p.Q149H e p.A275T na proteína SRGAP1 levavam a alterações de actividade da proteína CDC42 que está envolvida na sinalização intracelular, assim como apresenta uma importante função na tumorigénese, pois está envolvida em processos celulares como a proliferação, migração e sobrevivência da célula. Desta forma, estes autores sugerem que o gene *SRGAP1* é um potencial gene de susceptibilidade para casos de PTC familiar (He *et al.*, 2013).

Recentemente, num estudo realizado no nosso grupo, o gene *FOXE1*, que codifica o factor de transcrição FOXE1 (crucial para a morfogénese da tiróide durante a embriogénese e pela manutenção da diferenciação e arquitectura normal da tiróide) foi proposto como gene de susceptibilidade para o FNMTc (Pereira *et al.*, 2015). No referido estudo, identificou-se uma variante germinal (c.743C>G; p.A248G) no gene *FOXE1* numa família com FNMTc, e num caso aparentemente esporádico de NMTC, não se encontrando, até à data, esta variante descrita na literatura. O estudo de segregação revelou que, na família com FNMTc, a variante segregava com cancro da tiróide em três membros dessa família, e no caso de NMTC, detectou-se a variante também no pai assintomático do probando. Estudos funcionais foram realizados usando *pools* de células PCCL3 e TPC-1, expressando as formas *wild type* e mutante (c.743C>G) da FOXE1, tendo-se observado que esta variante promove a proliferação e migração celular, sugerindo assim que a variante pode estar envolvida na tumorigénese da tiróide (Pereira *et al.*, 2015). Um outro estudo recente do nosso grupo demonstrou que polimorfismos localizados no *locus FOXE1*, estavam significativamente associadas a um aumento do risco do cancro da tiróide, confirmando a existência de uma associação deste *locus* com a susceptibilidade para o NMTC familiar e esporádico (Tomaz *et al.*, 2012).

Ngan e os seus colaboradores analisaram mutações germinais no gene *TTF-1/NKX2-1* em 20 doentes com PTC não relacionados com história familiar de MNG (MNG/PTC), 284 doentes com PTC não relacionados sem história de MNG (PTC) e 349 indivíduos saudáveis. Neste estudo, foi identificada uma variante germinal (p.A339V) em 20% dos doentes com MNG/PTC de 2 famílias. Estes autores observaram que a sobre-expressão da proteína TTF-1 com a variante A339V em células PCCL3, em comparação com a proteína TTF-1 *wild type*, induzia um aumento da proliferação celular dependente de tirotropina (TSH), assim como à activação da via STAT3, levando a uma diminuição da transcrição de genes específicos da tiróide, como por exemplo, *TSH-R* e *Pax-8* (Ngan *et al.*, 2009).

Estudos recentes que envolveram a sequenciação global do exoma (WES), identificaram uma variante germinal (p.G534E) no gene *HABP2*, em sete membros de uma família com FNMTc e em 20/423 (4,7%) doentes com cancro da tiróide esporádico. Esta variante estava associada a um aumento da expressão da proteína HABP2 em amostras de tumor provenientes de doentes da família com FNMTc, contrastando com a ausência de expressão desta proteína em tecido normal da tiróide, e com uma menor expressão em tecido de casos esporádicos de PTC. Estudos funcionais demonstraram que a expressão desta variante levava a um aumento do número de colónias, da formação de focos e da migração celular, características de transformação maligna das células, sugerindo assim que *HABP2* seja um gene de susceptibilidade para o FNMTc (Gara *et al.*, 2015).

5.1 Gene *C8orf48*

O estudo de mapeamento genético realizado pelo nosso grupo numa família Portuguesa com FNMTc, a partir de uma análise de *linkage* que abrangeu todo o genoma (GWLS) sugeriu que o gene de susceptibilidade para as neoplasias da tiróide na referida família estaria no cromossoma 8p23-p22, na região 9 000 000 - 17 000 000 bp, tendo este *locus* sido designado por *FTEN* (*Familial Thyroid Epithelial Neoplasia*) (Cavaco *et al.*, 2008b).

Com o objectivo de identificar o gene de susceptibilidade nesta família, o DNA genómico de um dos familiares afectados foi analisado por sequenciação global do exoma (WES), usando o sistema *Agilent* no equipamento *Illumina HiSeq2000*. Esta análise incluiu a hidrólise do DNA, preparação de uma biblioteca de DNA, captura dos exões usando *Sureselect Human all exon 50 Mb* (*Agilent*), sequenciação num *HiSeq 2000* (*Illumina*) e análise bioinformática. Esta análise resultou na identificação de 60829 variantes genéticas no exoma do doente, que foram anotadas de acordo com a informação disponível na *database* Ensembl (www.ensembl.org/index.html).

Para identificar as variantes com maior probabilidade de serem patogénicas, excluíram-se as variantes: sinónimas; com uma frequência maior do que 1% na população; em homozigotia e com impacto desconhecido localizadas na região 3' e 5' não traduzida (3'UTR e 5'UTR). Posteriormente, foram seleccionadas as variantes localizadas na região mapeada no cromossoma 8 (posição 9-17 Mb), tendo sido analisado o seu efeito nas proteínas codificadas, através do estudo da conservação do aminoácido alterado entre espécies, e da previsão de alterações na estrutura secundária da proteína e de alterações de hidrofobicidade. Por fim, as variantes que apresentavam maior probabilidade de envolvimento na tumorigénese nesta família foram confirmadas por sequenciação de Sanger, tendo sido identificada uma variante potencialmente patogénica no gene candidato *C8orf48*.

O gene *C8orf48* é um gene com apenas um exão, que codifica um transcrito de 1445 bp, e que é traduzido para uma proteína com 319 resíduos de aminoácidos. A expressão do mRNA deste gene foi confirmada em leucócitos e num tumor de um dos doentes da família estudada. A análise, com 4 anticorpos diferentes, da expressão da proteína *C8orf48* detectou níveis de expressão médios/elevados em 38 de 78 tecido normais distintos, incluindo tiróide, rim, pulmão e cólon, e esta expressão foi observada no citoplasma e no núcleo das células (The Human Protein Atlas - www.proteinatlas.org).

A variante genética identificada no gene *C8orf48* localiza-se no códon 22 deste gene e consiste na transição de uma citosina para uma timina (c.65C>T), o que conduz a uma substituição de um resíduo de treonina por um resíduo de isoleucina (p.T22I) (Pereira, 2012). O estudo de segregação revelou que, para além do probando, 14 familiares (12 apresentavam doença tiroideia e 2 eram normais) também apresentavam a variante c.65C>T no gene *C8orf48* (Pereira, 2012). Observou-se ainda que, esta variante genética não se encontrava presente em 50 controlos normais, não sendo por isso um polimorfismo comum na população Portuguesa. A sequência deste gene foi conservada na evolução, sugerindo que a sua função possa ser relevante (Pereira, 2012).

Apesar desta variante não ter sido descrita na literatura, recentemente, observou-se que esta tinha sido descrita na base de dados ENSEMBL, num único indivíduo de uma população de 285 descendentes de Europeus (www.ensembl.org/index.html).

A única informação existente até à data na literatura sobre a proteína codificada pelo gene *C8orf48* é sua interacção com a proteína MDFI, codificada pelo gene *MyoD family inhibitor (MDFI)*, proteína que está envolvida na via de sinalização Wnt (Komiya e Habas, 2008; Venkatesan *et al.*, 2009).

As proteínas Wnt regulam uma variedade de processos celulares, incluindo a morte celular, motilidade, polaridade, formação dos eixos primários e organogénese. Uma vez que esta via de sinalização tem um papel fundamental durante a embriogénese e é altamente regulada, a expressão das proteínas Wnt e antagonistas Wnt são controladas, tanto temporalmente como espacialmente, durante o desenvolvimento do organismo (Komiya e Habas, 2008).

Sem activação da via metabólica Wnt, a β -catenina citoplasmática é degradada pelo complexo proteico APC/Axina/GSK3/CK1 α . A fosforilação da β -catenina pela caseína cinase 1 α (CK1) e glicogénio sintase cinase (GSK3) promove a sua ubiquitinação e destruição proteolítica no proteossoma, mediada pela proteína β -Trcp (Figura I-8) (Komiya e Habas, 2008). Por outro lado, a ligação da proteína Wnt ao complexo receptor, que é composto pelas proteínas Fz e LRP5/6 é promovida a partir de uma sinalização, como por exemplo, pela ligação da proteína MDFI ao complexo proteico Axina, que induz a sua translocação para a membrana e a fosforilação do complexo LRP5/6. Esta ligação da Axina ao complexo LRP5/6 inibe a actividade da mesma nesta via metabólica, levando à activação da proteína Dsh. Estando esta proteína activa, a actividade das enzimas GSK3 e CK1 é inibida, o que conduz a uma série de eventos que impedem a degradação da β -catenina e consequentemente, à sua estabilização e acumulação no citoplasma (β -catenina livre) (Figura I-8) (Komiya e Habas, 2008). A β -catenina livre no citoplasma desloca-se para o núcleo da célula, funcionando como co-ativador transcripcional de genes alvo (Komiya e Habas, 2008).

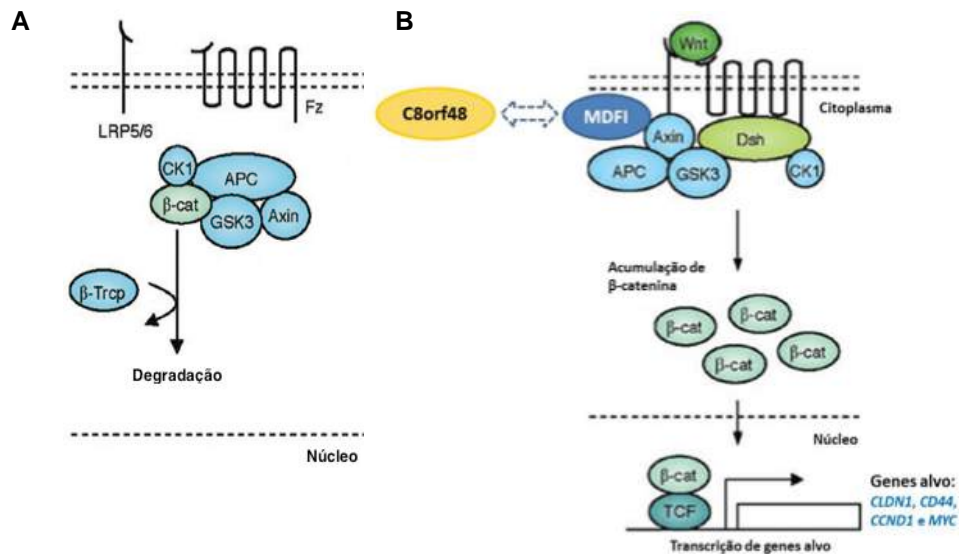


Figura I-8 - Representação esquemática da via de transdução de sinal Wnt (adaptado de Komiya e Habas, 2008).

A) na ausência do ligando Wnt, o complexo APC/Axina/GSK3/CK1α é formado no citosol. A β-catenina é fosforilada pelo CK1α e GSK3, o que promove a sua degradação pelo proteossoma, mediada pela β-TrCP.

B) a ligação da Wnt ao receptor Fz e co-receptor LRP5/6, promovida pela proteína MDI, que se liga à Axina, permite a translocação do complexo proteico que contém a Axina do citosol para a membrana plasmática, induzindo a fosforilação do complexo LRP5/6. A partir desta fosforilação, a proteína Dsh é também recrutada para a membrana, inibindo a actividade das enzimas GSK3 e CK1α, permitindo uma estabilização e acumulação da β-catenina no citoplasma. Posteriormente, a β-catenina livre é translocada para o núcleo, funcionando como co-ativador transcripcional de genes alvo.

Para clarificar qual o papel/interacção da proteína codificada pelo gene *C8orf48* com a via Wnt, foi analisada com *micro-arrays* de oligonucleótidos a expressão de alguns genes alvo, cuja expressão é regulada pela ligação da β-catenina aos seus promotores, no tumor do probando desta família, (estudo realizado por Jaime Pita, do grupo de Endocrinologia Molecular, UIPM/IPO-Lisboa). A análise de *micro-arrays* revelou que os genes *CLDN1*, *CD44*, *CCND1* e *MYC* se encontravam sobre-expressos no tumor, uma vez que se observou existir uma diferença significativa na expressão destes genes entre o tecido tumoral e o tecido normal deste caso. No entanto, este tumor também apresentava uma mutação somática no gene *BRAF*, o que poderá igualmente ter contribuído para o aumento de expressão dos referidos genes-alvo (Pereira, 2012).

6 Utilização de novas tecnologias de sequenciação na identificação de genes de susceptibilidade para FNMTc

6.1 Sequenciação global do exoma (WES)

A sequenciação de Sanger e o PCR estabeleceram diversos marcos na área da genética, como por exemplo, a sequenciação global do genoma, obtendo-se referências para a investigação de alterações genéticas e fenótipos associados (Rabbani *et al.*, 2014).

Na sequenciação de Sanger, ocorre a síntese de cadeias de DNA que possuem nucleótidos marcados numa das extremidades e que diferem entre si por um nucleótido, a partir de um fragmento

de DNA a ser sequenciado (Lodish *et al.*, 2004). A síntese das cadeias truncadas é conseguida pelo uso de 2',3'-didesoxinucleótidos trifosfatos (ddNTPs) marcados com fluorescência. Estas moléculas são semelhantes aos desoxinucleótidos normais (dNTPs), mas distinguem-se destes por não apresentarem um grupo hidroxilo no carbono 3'. Assim, os ddNTPs podem ser incorporados na cadeia de DNA que se encontra em síntese pela DNA polimerase, mas não podem formar uma ligação fosfodiéster com outro nucleótido trifosfatado, pelo que a sua incorporação resulta na formação de uma cadeia truncada (devido à terminação prematura da síntese da cadeia) (Lodish *et al.*, 2004).

As novas tecnologias desenvolvidas permitem realizar a sequenciação global do genoma (WGS – *Whole Genome Sequencing*) e sequenciação global do exoma (WES – *Whole Exome Sequencing*) com um menor custo de sequenciação por genoma/exoma e com uma maior rapidez, a partir de técnicas como a pirosequenciação, sequenciação por semicondutores e sequenciação por síntese (Ronaghi M, 2001; Rothberg *et al.*, 2011; Brockmen *et al.*, 2008). Esta revolução das tecnologias de sequenciação, designadas por sequenciação de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) tem permitido identificar alterações genómicas envolvidas no desenvolvimento do cancro (Shyr e Liu, 2013).

A utilização da WES facilita a identificação de mutações responsáveis por doenças hereditárias, dado que não é necessário seleccionar *a priori* genes candidatos, e porque sequencia todo o exoma, região onde se localizam 85% das mutações patogénicas, sendo uma técnica menos dispendiosa do que o WGS (Choi *et al.*, 2009; Nuytemans e Vance, 2010).

Contudo, a produção de informação resultante da sequenciação global do exoma, que está a crescer exponencialmente, deverá ser gerida e organizada, de maneira a estar disponível aos investigadores e clínicos, e as ferramentas bioinformáticas deverão ser mais acessíveis e intuitivas (*user-friendly*), para que toda esta informação possa contribuir para aumentar o conhecimento actual sobre a patogénese, prevenção e tratamento de doenças genéticas (Rabbani *et al.*, 2014).

Actualmente, é possível combinar os resultados obtidos em estudos de *linkage* do genoma com os resultados de WES para identificar variantes potencialmente patogénicas nas regiões candidatas (regiões de *linkage*) (Gazal *et al.*, 2015). Esta estratégia foi adoptada pelo nosso grupo para identificar a variante c.65C>T no gene *C8orf48*.

Objectivos

Neste projecto de Mestrado pretendeu-se identificar e caracterizar funcionalmente uma nova variante identificada num gene candidato para o FNMTc. Os objectivos específicos foram os seguintes:

- 1- Clarificar o papel da variante c.65C>T (p.T22I) do gene *C8orf48*, identificada numa família com FNMTc, através de estudos funcionais *in vitro*, que envolveram a sobre-expressão exógena deste gene em diferentes modelos celulares e o estudo do efeito na proliferação e migração celular.
- 2- Investigar qual a função do gene *C8orf48* na tumorigénese, através do silenciamento da sua

INTRODUÇÃO

expressão com siRNA, numa linha celular de carcinoma papilar da tiróide e estudo do efeito no ciclo celular e morte celular.

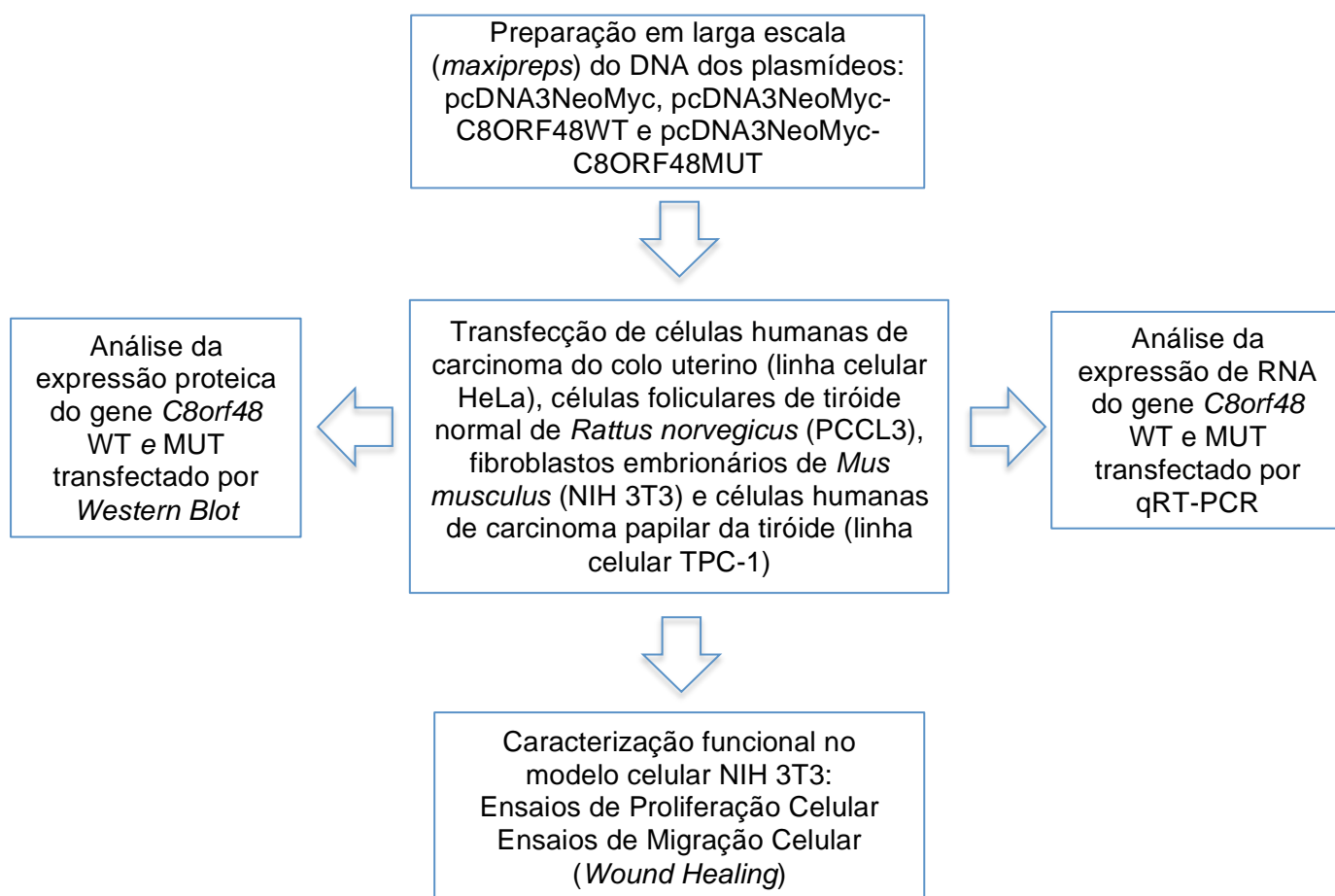
II MATERIAIS E MÉTODOS

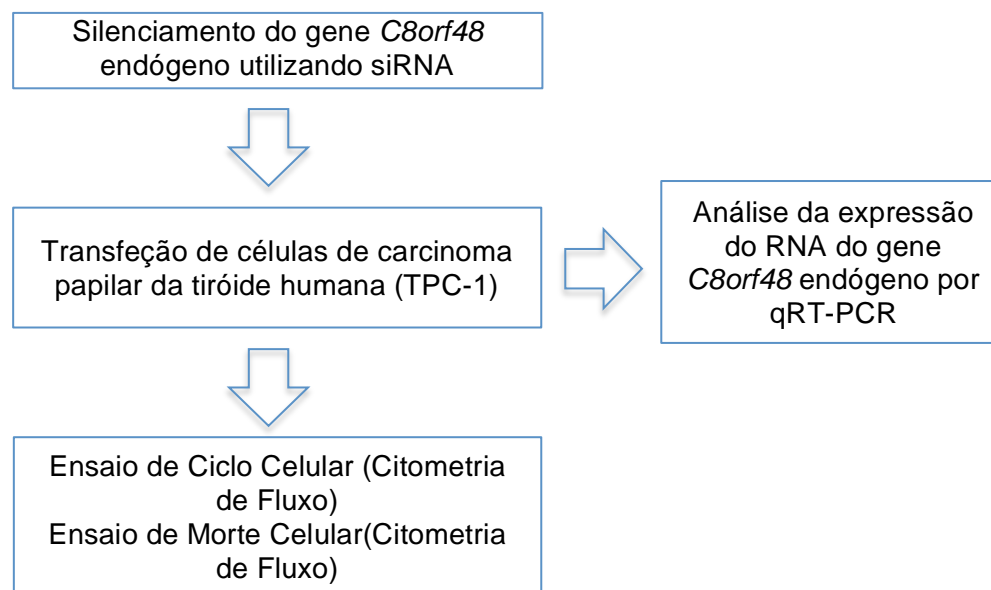
1 Amostras biológicas

Para o estudo do gene *C8orf48*, analisaram-se os indivíduos de uma família com FNMTc (família 1, a árvore genealógica desta família encontra-se representada na Figura III-1), cujo gene responsável foi mapeado pelo nosso grupo (ver Introdução).

Neste estudo, os doentes foram identificados pelo serviço de Endocrinologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPO-Lisboa), e a recolha de sangue/saliva foi realizada após consentimento informado dos doentes e dos familiares. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética do IPO-Lisboa.

Esquema representativo do protocolo efectuado para caracterização funcional da variante p.T22I identificada no gene *C8orf48* e estudo do papel deste gene na tumorigénese.





2 Cultura de células

Para este estudo, foram utilizadas duas linhas celulares tumorais: células humanas de carcinoma do colo uterino (HeLa), e células humanas de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1) (estas últimas gentilmente cedidas pela Doutora Paula Soares do IPATIMUP, Porto). Foram também utilizados fibroblastos embrionários de rato (NIH 3T3) (cedidas gentilmente pelo Dr. Paulo Matos, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa) e células PCCL3, provenientes da clonagem de células foliculares de tiróide normal de *Rattus norvegicus* (gentilmente cedidas pelo Professor Dumont do Institut de Recherche Interdisciplinaire en Biologie Humaine et Moléculaire, Faculté de Médecine, Université Libre de Bruxelles, Bélgica). O manuseamento das células foi sempre realizado em ambiente estéril, numa câmara de fluxo laminar (*Microflow Biological Safety Cabinet, Intermed*®). Todas as células foram mantidas numa estufa (*Nuaire™ US Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator*), num ambiente humidificado, a 5% CO₂, à temperatura de 37°C.

As células PCCL3 foram propagadas em meio de cultura *Hams F-12 Coon's Modification with L-Glutamine* (*Euroclone*, Itália), suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (FBS) (*GIBCO™*, EUA), insulina 1x (*Sigma-Aldrich*), hormona estimuladora da tiróide (TSH) 1 mUI/ml (*Sigma-Aldrich*), apotransferrina 1 mg/ml (*Sigma-Aldrich*), 1x L-Glutamina (*GIBCO™*, EUA) e antibiótico antimicótico 1x (*GIBCO™*, EUA). As células HeLa e TPC-1 foram propagadas em meio de cultura DMEM (*GIBCO™*, EUA), suplementado com 10% (v/v) de FBS, 1x L-Glutamina (*GIBCO™*, EUA) e antibiótico antimicótico 1x (*GIBCO™*, EUA). As células NIH 3T3 foram propagadas em meio de cultura DMEM (*GIBCO™*, EUA), suplementado com uma concentração de soro de vitela recém-nascida (NCBS) (*GIBCO™*, EUA) variável [0,5%, 5%, 10% (v/v)], de acordo com o procedimento, 1x L-Glutamina (*GIBCO™*, EUA) e antibiótico antimicótico 1x (*GIBCO™*, EUA).

Todos os reagentes conservados a 4°C, antes de serem utilizados, foram aquecidos a 37°C para evitar o stresse celular provocado pela diferença de temperatura. Para manter a esterilidade, os reagentes foram abertos e utilizados apenas dentro da câmara de fluxo laminar. A observação das

células foi realizadas através de um microscópio invertido *Axiovert 135* (Zeiss, Alemanha).

2.1 Descongelação de células

As células HeLa, PCCL3 e TPC-1 foram criopreservadas numa solução de congelação contendo FBS e DMSO (*Sigma-Aldrich*) a 10% (v/v), enquanto que as células NIH 3T3 foram criopreservadas com NCBS e DMSO a 10% (v/v). O DMSO é um crioprotector que é adicionado na solução de congelação para reduzir a formação de cristais de gelo, que poderiam causar a lise celular durante o processo de congelação.

Após os tubos serem descongelados rapidamente com as mãos, retiraram-se as células do seu interior com uma seringa de 1 ml e transferiram-se para um tubo estéril de 50 ml, contendo 25 ml de meio de cultura não suplementado, para remover o DMSO. Após centrifugação durante 5 minutos a 1200 rpm (rotações por minuto) (*Labofuge 400, Heraeus Instruments*), descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em 5 ml de meio suplementado. Por fim, transferiu-se a suspensão celular para um frasco de cultura de 260 cm³, contendo 10 ml de meio suplementado e colocaram-se os frascos numa estufa de CO₂, deixando o frasco mal rolhado, de forma a permitir as trocas gasosas.

2.2 Criopreservação das células

A criopreservação das células foi feita a partir de frascos de 260 cm³ com uma confluência de 90-100%. Após remover as células do frasco, com tripsina-EDTA (ver ponto 2.3), centrifugou-se e removeu-se o sobrenadante, ressuspendendo-se de seguida o *pellet* celular em 2 ml de solução de congelação [composta por 1,8 ml de FBS ou NCBS e 200 µl de DMSO 10% (v/v)]. De seguida, distribuiu-se 1 ml de suspensão celular por duas ampolas de congelação, colocou-se as ampolas a -70°C durante 1 hora e posteriormente armazenou-se em azoto líquido (a -196°C).

2.3 Propagação e expansão das células

As células foram propagadas em frascos de 260 cm³ no meio apropriado suplementado, o qual foi renovado a cada 3/4 dias, para evitar a sua saturação e a insuficiência de nutrientes. Quando os frascos apresentavam uma confluência elevada (90%), transferiu-se as células para novos frascos de 260 cm³, e para tal, foi necessário remover o meio e lavar as células com PBS sem magnésio e sem cálcio (*Phosphate Buffared Saline -Mg²⁺/Ca²⁺; GIBCO™*). O PBS é uma solução salina que é utilizada neste procedimento com objetivo de manter as células em condições ótimas de pH no curto período em que as células são manipuladas. Para além desta solução permitir a remoção de células mortas e de resíduos de soro, que poderia inibir a tripsina, esta solução não contém cátions divalentes (como por exemplo, Ca²⁺ e Mg²⁺) que atuam como inibidores da tripsina, o que permite com que haja uma dissociação das ligações entre as células (aderentes) e à superfície do frasco por acção da tripsina-EDTA. Para além da tripsina provocar a dissociação das ligações nas interações célula-célula e/ou célula-substrato, o EDTA, uma vez que é um agente quelante, permite com que haja a inactivação dos restantes iões divalentes presentes no meio, aumentando assim a eficácia de dissociação das células.

Após a adição de 2 ml de tripsina-EDTA (*GIBCO*TM) a cada frasco, agitou-se suavemente o frasco de cultura, de modo a cobrir todas as células com a tripsina e incubou-se o frasco a 37°C durante 2 minutos.

Após a perda de aderência das células, a tripsina foi neutralizada pela adição de meio não suplementado. Posteriormente, transferiu-se as células para um tubo de 50 ml e centrifugou-se este a 1200 rpm, durante 5 minutos (*Labofuge 400, Heraeus Instruments*). Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em meio de cultura suplementado. Transferiu-se a suspensão celular para novos frascos de cultura, perfez-se o volume do frasco num volume total de 15 ml com meio suplementado e colocou-se estes frascos na estufa a 37°C, em ambiente 5% de CO₂, deixando o frasco mal rolhado para permitir as trocas gasosas necessárias para o metabolismo da célula.

3 Transfecção de células HeLa, PCCL3, NIH 3T3 e TPC-1 com vectores derivados do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

3.1 Transfecções transitórias

A transfecção é um processo que consiste na introdução de ácidos nucleicos em células eucarióticas, a partir de métodos não virais. Nas transfeções transientes, o DNA exógeno não se integra no genoma da célula e os genes transfectados são expressos por um período de tempo limitado. No entanto, nas transfeções estáveis, as células integram o DNA no seu genoma e consequentemente, as células descendentes das transfectadas irão também expressar os genes transfectados (Kim e Eberwine, 2010).

Para a transfecção transiente de células HeLa, plaquearam-se $3,5 \times 10^5$ células HeLa por placa de 8,5 cm² (35mm) (*Orange Scientific*, Bélgica). Passado 24 horas após o plaqueamento, diluiu-se 2 µg de DNA plasmídico (pcDNA3NeoMyc, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT) e adicionou-se o volume de DNA plasmídico diluído a 125 µl de meio OPTI-MEM (*GIBCO*TM). Diluiu-se também 4 µl de lipofectamina (*Lipofectamine*® 2000, *Invitrogen*TM) em 125 µl de OPTI-MEM e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se o DNA diluído com a lipofectamina e misturou-se com a pipeta, incubando à temperatura ambiente durante 20 minutos. A lipofectamina contém subunidades lipídicas que podem formar lipossomas em meio aquoso e consequentemente, transportar material genético, como por exemplo, DNA plasmídico. A transfecção ocorre devido às interações eletrostáticas, uma vez que as cargas positivas dos lipossomas vão interagir com as cargas negativas dos ácidos nucleicos, formando o complexo DNA-lipofectamina. Este complexo, com a ajuda dos *neutral co-lipid*, funde-se com a membrana plasmática, impedindo com que haja repulsão eletrostática da membrana plasmática com os ácidos nucleicos, permitindo com que o DNA plasmídico entre na célula (Dalby *et al*, 2004). Durante os 20 minutos de incubação do DNA com a lipofectamina, removeu-se o meio de cada uma das placas e lavou-se com 2 ml de meio suplementado, sem antibiótico. De seguida, adicionou-se o volume total do complexo DNA-lipofectamina (~255 µl) a cada placa, agitou-se a placa ligeiramente e incubou-se as células a 37°C,

em ambiente 5% de CO₂, durante 24 horas.

Para as transfecções das células PCCL3, foi otimizado o protocolo de transfecção indicado anteriormente, relativamente à quantidade de células, concentração de DNA e volume de lipofectamina (Tabela IV). Após o teste das várias condições, foram obtidas melhores condições de transfecção com a proporção de DNA:lipofectamina de 1:2, para um total de 4 µg de plasmídeo e um número total de células por placa de 15x10⁵.

Relativamente às transfecções de células NIH 3T3 com vectores derivados de pcDNA3NeoMyc, as transfecções realizaram-se com uma proporção DNA:lipofectamina de 1:2, para um total de 2 µg de plasmídeo e um número total de células por placa de 5x10⁵.

Tabela IV – Condições para optimização da transfecção das células PCCL3

Condições	1	2	3	4	5	6	7	8
Lipofectamina:DNA	1:2		1:2		1:2		1:2	
Lipofectamina (µl)	5	8	5	8	5	8	5	8
Total plasmídeo (µg)	2,5	4	2,5	4	2,5	4	2,5	4
Número de células	2,5x10 ⁵		5x10 ⁵		10x10 ⁵		15x10 ⁵	

3.2 Estabelecimento de pools de células HeLa e NIH 3T3 com expressão estável de vectores derivados do plasmídeo pcDNA3NeoMyc

As células que sofrem transfecção estável podem ser seleccionadas a partir da expressão de um gene que é co-integrado no genoma, com o gene em estudo, (normalmente presente como uma unidade independente transcripcional no vector de expressão transfectado) e que confere resistência a um antibiótico específico utilizado nessa selecção.

Para preparação das *pools* de células com expressão estável dos diferentes plasmídeos (pcDNA3NeoMyc, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT), 48 horas após transfecção, iniciou-se a selecção das células que apresentavam resistência à geneticina (G418, *Sigma Aldrich*). Esta selecção com geneticina (1000 µg/ml) decorreu durante 3 semanas.

3.3 Transfecções transientes do siRNA em células TPC-1

A transfecção transiente do siRNA (Anexos, Tabela IX) para o gene *C8orf48* foi feita utilizando 1,5x10⁵ células TPC-1, em placas de 8,5 cm² (35 mm) (*Orange Scientific*, Bélgica). Vinte e quatro horas após o plaqueamento (confluência das placas a 50%), preparou-se 5 µl (100 pmol) de oligonucleótidos em 250 µl de meio OPTI-MEM (*GIBCO™*). Diluiu-se também 4 µl de lipofectamina (*Lipofectamine® 2000, Invitrogen™*) em 250 µl de OPTI-MEM e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se o siRNA com a lipofectamina e misturou-se com a micropipeta, incubando à temperatura ambiente durante 20 minutos. Durante este período de incubação do siRNA com a lipofectamina, removeu-se o meio de cada uma das placas e lavou-se com 2 ml de meio suplementado, sem antibiótico. De seguida, adicionou-se o volume total do complexo siRNA-

lipofectamina (~505 µl) a cada placa, agitou-se a placa ligeiramente e incubou-se as células a 37°C em estufa com ambiente 5% de CO₂, durante 24 e 48 horas, para otimizar as condições de transfecção de siRNA nesta linha celular.

Para o controlo negativo do siRNA, o procedimento de transfecção foi idêntico, utilizando-se apenas 2 µl (50 pmol) de oligonucleótido.

3.3.1 Transfecção transiente de vectores derivados de pcDNA3NeoMyc em células TPC-1

Para estudar os efeitos dos vectores derivados de pcDNA3NeoMyc (pcDNA3NeoMyc, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT) após o silenciamento do gene *C8orf48* com o siRNA, 24 horas após a transfecção das células TPC-1 com o siRNA, realizou-se uma segunda transfecção com os vectores atrás indicados. Adicionou-se 1250 ng de DNA juntamente com 50 pmol de siRNA, para um volume de 250 µl de meio OPTI-MEM (GIBCO™). Diluiu-se também 4 µl de lipofectamina (*Lipofectamine*® 2000, Invitrogen™) em 250 µl de OPTI-MEM e incubou-se 5 minutos à temperatura ambiente. Juntou-se o DNA+siRNA com a lipofectamina e misturou-se com a pipeta, incubando à temperatura ambiente durante 20 minutos. Durante este período de incubação do DNA+siRNA com a lipofectamina, removeu-se o meio de cada uma das placas e lavou-se com 2 ml de meio suplementado, sem antibiótico. De seguida, adicionou-se o volume total do complexo DNA-siRNA-lipofectamina (~510 µl) a cada placa, agitou-se a placa ligeiramente e incubou-se as células a 37°C numa estufa em ambiente 5% de CO₂, durante 24 horas.

Para a placa que tinha sido inicialmente transfectada com o controlo negativo do siRNA, 24 horas após esta transfecção, realizou-se uma segunda nas condições indicadas anteriormente, a uma concentração de 50 pmol de oligonucleótido.

4 Extração de RNA

Para se realizar a extração de RNA a partir das *pools* de HeLa e NIH 3T3, e das células TPC-1 transfectadas com o siRNA para o gene *C8orf48*, seguiu-se o protocolo recomendado pelo fabricante do *RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Alemanha), com algumas alterações.

Primeiramente, propagaram-se ambas as *pools* em frascos de 75 cm². Quando a confluência celular nestas placas atingiu os 100% fez-se a recolha das células. Para tal, removeu-se o meio dos frascos, lavou-se uma vez com 2 ml de uma solução salina de PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺) (GIBCO™). Adicionou-se 2 ml de tripsina-EDTA (GIBCO™) a cada frasco e incubaram-se os frascos durante 5 minutos a 37°C. Neutralizou-se a tripsina com 8 ml de meio não suplementado e transferiu-se a suspensão celular para um tubo de 50 ml. Posteriormente, centrifugou-se o tubo a 1200 rpm (*Labofuge 400*, Heraeus Instruments, raio do rotor = 170 mm), durante 3 minutos e removeu-se completamente o sobrenadante. Ressuspendeu-se o *pellet* celular em 600 µl de tampão de lise celular RLT com β-mercapto-etanol 10% (v/v) (Tabela V).

Ao tubo com o *pellet* lisado, adicionou-se um volume igual de etanol a 70% (v/v) (Tabela V) e homogeneizou-se com uma pipeta. Transferiu-se a amostra (até 700 µl) para uma coluna *RNeasy*, colocada num tubo de 2 ml. Centrifugou-se a amostra a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*, raio do rotor = 95mm) durante 30 segundos. Quando o volume da amostra excedeu os 700 µl, após a

primeira centrifugação, adicionou-se o restante volume na mesma coluna para uma segunda centrifugação em condições iguais às anteriores.

Adicionou-se 700 µl de tampão RW1 (Tabela V) à coluna *RNeasy* e centrifugou-se a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 15 segundos, para remover da coluna os compostos que não tinham afinidade com a mesma. Descartou-se o eluído e adicionou-se 500 µl de tampão RPE (Tabela V) à coluna *RNeasy*. Centrifugou-se a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 15 segundos. Descartou-se o eluído e adicionou-se, novamente, 500 µl de tampão RPE à coluna. Centrifugou-se o tubo a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 2 minutos, para remover completamente os resíduos de etanol da membrana da coluna. De seguida, descartou-se o eluído e centrifugou-se a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto.

Transferiu-se a coluna para um novo tubo colector de 1,5 ml e adicionou-se 30 µl de água *RNase-free* directamente sobre a membrana da coluna. Após 5 minutos, centrifugou-se a amostra a 10000 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*) durante 1 minuto, para eluir o RNA. Por fim, quantificou-se o RNA obtido por espectrofotometria (ver ponto 5 desta secção) e armazenou-se a -70°C.

Tabela V - Função dos tampões utilizados para extração de RNA

Solução	Função
Tampão RLT com β-mercapto-etanol	Tampão RLT (sais guanidina): Lise celular e promoção de ligação do RNA à coluna de sílica <i>RNease</i> β-mercapto-etanol: desnaturação das RNases
Etanol 70%	Precipitação do RNA total
Tampão RW1	Remoção de compostos biomoleculares que não tem afinidade com a coluna de sílica <i>RNease</i> (proteínas, ácidos gordos, DNA).
Tampão RPE	Remoção de sais da coluna (provenientes dos tampões utilizados anteriormente).
Água <i>RNase-free</i>	Prevenção da degradação do RNA.

5 Quantificação espectrofotométrica de RNA

Para quantificar o RNA extraído a partir de amostras biológicas realizou-se o doseamento espectrofotométrico. Este método permite determinar a quantidade de ácidos nucleicos, quantificando a radiação ultravioleta (UV) que é absorvida pelas purinas e pirimidinas que constituem a cadeia do RNA (Sambrook e Russel, 2001).

Tal como descrito pela lei de Lambert-Beer, a absorvância de uma determinada amostra a um comprimento de onda específico e a uma espessura fixa é directamente proporcional à concentração do material absorvente, ou seja (Sambrook e Russel, 2001):

$A = \epsilon bc$, em que A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de extinção molar ($M^{-1}cm^{-1}$), b é a espessura da célula (cm) e c é a concentração da amostra (M).

As leituras espectrofotométricas foram efectuadas a 260 nm e 280 nm (*Thermo Scientific NanoDrop 2000*, EUA), que são os comprimentos de onda correspondentes aos máximos de

absorção dos ácidos nucleicos e das proteínas, respectivamente.

Uma absorvância ou densidade óptica (DO) de 1 corresponde a uma concentração de 50 µg/ml para o DNA em cadeia-dupla, e a 40 µg/ml para o DNA em cadeia simples ou para o RNA. Assim, a concentração de ácidos nucleicos é determinada pelas seguintes equações (Sambrook e Russel, 2001):

$$[\text{RNA}] (\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260} \times 40\text{ng}/\mu\text{l} \times \text{factor de diluição}$$

A razão entre as leituras a 260 nm e a 280 nm ($\text{DO}_{260} : \text{DO}_{280}$) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. As amostras puras de DNA e de RNA têm valores de $\text{DO}_{260} : \text{DO}_{280}$ de 1,8 e 2,0, respectivamente. Se existir uma contaminação significativa com proteínas ou fenol, as razões de $\text{DO}_{260} : \text{DO}_{280}$ apresentarão valores inferiores aos acima referidos, e desta forma não será possível fazer uma quantificação precisa da concentração de ácido nucleico (Sambrook e Russel, 2001).

6 Síntese de cDNA por transcrição reversa do RNA

O RNA extraído a partir das pools HeLa, NIH 3T3 e TPC-1 foi utilizado para a síntese do DNA complementar de cadeia simples (cDNA). Neste procedimento de síntese são utilizados *primers* aleatórios (*random primers*) que hibridam com os diferentes mRNAs que existem na célula. A extensão dos *primers* é realizada pela enzima transcriptase reversa, que utiliza o RNA como molde para a síntese de cDNA. Posteriormente, a partir do cDNA obtido realiza-se a amplificação por PCR dos exões dos genes que se pretendem estudar.

Para a síntese do cDNA, prepararam-se duas misturas reacionais. Na primeira, juntou-se 1 µg de RNA com 0,4 µl de desoxirribonucleótidos (dNTPs) (25 mM, *Invitrogen*TM), 0,1 µl de *random primers* (*Invitrogen*TM) e água bidestilada estéril tratada com DEPC para perfazer o volume final de 12,5 µl. Homogeneizou-se a mistura reacional, incubou-se a 65°C durante 10 minutos, centrifugou-se brevemente o tubo (*spin down*) e colocou-se este em gelo. Na segunda mistura reaccional, juntou-se 100 mM de ditioneitol (DTT) (*Invitrogen*TM), 20 U de *RNaseOut*TM (40U/ µl, *Invitrogen*TM), uma solução tamponada 5x *First-Strand Buffer* (*Invitrogen*TM), 200 U de transcriptase reversa *SuperScript II RT* (200U/ µl, *Invitrogen*TM) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final de 7,5 µl. Homogeneizou-se a mistura, adicionou-se os 7,5 µl da segunda mistura reaccional aos 12,5 µl da primeira mistura e fez-se *spin down* do tubo. No termociclador (*T3 thermocycler*, *Biometra*, *Alemanha*), incubou-se a reacção durante 50 minutos a 42°C. Posteriormente, inactivaram-se as enzimas intervenientes na reacção a 70°C durante 15 minutos. Os cDNAs obtidos foram armazenados a -20°C.

7 Amplificação de cDNA por PCR

Para amplificação *in vitro* de uma região específica do cDNA, recorreu-se a uma reacção em cadeia catalisada pela enzima polimerase (*Polymerase Chain Reaction* – PCR). Neste método utiliza-se dois *primers* de oligonucleótidos que hibridam com a cadeia molde de cDNA (ou *template*) para sintetizar novas sequências de cDNA (Elrich, 1989). A primeira demonstração deste processo foi

realizada por Saiki e os seus colaboradores em 1985, no entanto, só em 1988 a técnica de PCR foi modificada, através da introdução de uma polimerase termoestável na reacção (Saiki *et al.*, 1988).

A partir da técnica de PCR, ocorre um aumento exponencial de fragmentos específicos de cDNA, dado que os produtos sintetizados num ciclo de PCR podem servir como molde no próximo ciclo, duplicando o número de cópias em cada ciclo (Elrich, 1989).

Cada ciclo de PCR é constituído por três passos: um passo de desnaturação do cDNA molde pelo calor, um passo de hibridação dos *primers* com as sequências alvo em cadeia simples e um passo de extensão dos *primers* emparelhados, efectuado por uma DNA polimerase termoestável (Sambrook e Russel, 2001).

Neste projeto, as reacções de PCR foram preparadas num volume final de 12,5 µl, apresentando a seguinte composição: 0,5 µl de cDNA, 10 pmol de *primer forward* e de *primer reverse* (Sigma-Aldrich, EUA), solução tamponada de PCR (1x concentrada; *Invitrogen*TM), 2,5 mM de desoxirribonucleótidos (dNTPs; *Invitrogen*TM), 1,2 mM de MgCl₂ (*Invitrogen*TM), 1U de *Taq DNA polymerase* (*Invitrogen*TM) e água bidestilada estéril para perfazer o volume final.

Para cada reacção de PCR foi realizado simultaneamente um controlo negativo, constituído por uma mistura reacional semelhante à das reacções de PCR, mas contendo água em substituição do DNA. O controlo negativo foi sujeito às mesmas condições que as reacções de PCR e foi utilizado para detectar a existência de possíveis contaminações.

As reacções de PCR foram processadas num termociclador (*T3 thermocycler Biometra*, Alemanha) com uma desnaturação inicial do cDNA molde durante 5 minutos a 95°C, seguindo-se 28 a 34 ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação incluiu: a) a desnaturação do cDNA molde a 95°C durante 1 minuto; b) o emparelhamento dos *primers* com o cDNA molde à temperatura de hibridação de 56-60°C (dependendo das condições óptimas de cada reacção) durante 1 minuto; c) a extensão das novas cadeias a 72°C durante 1 minuto. Após os ciclos de amplificação foi realizada uma extensão final a 72°C, durante 10 minutos.

7.1 Optimização das condições de PCR

Para que o DNA de cada amostra sob estudo fosse amplificado com uma elevada especificidade, as condições de PCR foram optimizadas, testando-se diferentes graus de estringência para a reacção. Para cada par de *primers* seleccionaram-se várias concentrações de MgCl₂ e várias temperaturas de hibridação.

O MgCl₂ é essencial para as reacções de PCR, pois os iões Mg²⁺ funcionam como co-factor da enzima *Taq DNA polymerase* e formam um complexo solúvel com os dNTPs (Sambrook e Russel, 2001). A concentração de magnésio pode também afectar a hibridação dos *primers*, a especificidade do produto de PCR e a formação de dímeros de *primers* (Innis *et al.*, 1990). Geralmente, uma baixa concentração de Mg²⁺ conduz a baixos rendimentos da reacção ou até mesmo à ausência de produtos de PCR, enquanto que concentrações elevadas de Mg²⁺ podem conduzir à acumulação de produtos inespecíficos (Sambrook e Russel, 2001).

A temperatura de hibridação também desempenha um papel crítico nas reacções de PCR. Se a temperatura de hibridação for demasiado elevada, a hibridação dos *primers* com o DNA *template* é

fraca, e assim, o rendimento do DNA amplificado é baixo (Sambrook e Russel, 2001). Se a temperatura de hibridação for demasiado baixa, pode ocorrer a hibridação inespecífica dos *primers*, resultando na amplificação de segmentos de DNA não desejados (Sambrook e Russel, 2001).

De um modo geral, a optimização das condições de PCR foi realizada utilizando uma concentração de $MgCl_2$ (1,2 mM) e três temperaturas de hibridação (58, 60 e 62°C). Por último, seleccionou-se a temperatura de hibridação e o número de ciclos de amplificação para as quais se observou um melhor rendimento do produto pretendido.

Em algumas reacções, teve de ser adicionado dimetilsulfóxido (DMSO, 3-6%), para aumentar o rendimento e a especificidade da reacção, uma vez que este composto orgânico impede a formação de estruturas secundárias no DNA *template*.

8 Eletroforese dos produtos de PCR em gel de agarose

A electroforese em gel de agarose permite separar fragmentos de DNA de acordo com o seu peso molecular. Esta técnica foi utilizada para determinar se a amplificação de cada fragmento de DNA tinha sido bem sucedida e para isso, utilizou-se géis de agarose de 2% (p/v) para se separar fragmentos de DNA lineares com um peso molecular entre 100-350 bp.

Para a preparação dos géis de agarose, dissolveu-se a agarose numa solução tamponada de TBE 1x concentrada a pH 8,0 (89 mM Tris-base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,0) e aqueceu-se a mistura até a agarose estar completamente dissolvida. Posteriormente, arrefeceu-se esta solução e adicionou-se brometo de etídeo (concentração final de 0,5 µg/ml). De seguida, verteu-se a mistura num molde contendo os pentes previamente colocados para definir o número de poços pretendidos no gel. Aguardou-se cerca de 20 minutos, por forma a ocorrer a polimerização do gel de agarose, e terminado este tempo, depositou-se o gel numa tina de electroforese horizontal, contendo uma solução tamponada de TBE 1x concentrada a pH 8,0.

De seguida, aplicaram-se as amostras de DNA e um marcador de peso molecular nos poços do gel. Este marcador é necessário para estimar o tamanho dos fragmentos de DNA. De acordo com o número de pares de bases do produto esperado, utilizou-se o marcador pUC 8 (permite determinar o peso molecular de fragmentos de DNA com um tamanho inferior a 1000 bp) (*Fermentas*, EUA) ou o marcador *Gene Ruler 50 bp DNA ladder* (permite determinar o peso molecular de fragmentos de DNA com um tamanho entre os 50 e 1000 bp) (*Thermo Fisher Scientific*TM, EUA). A cada uma das amostras de DNA (volume de 7,5 µl) juntou-se 1 µl da solução de deposição (*DNA Loading Dye 6x*; *Thermo Fisher Scientific*TM, EUA). As electroforeses foram realizadas sob uma diferença de potencial constante de 140 V, durante aproximadamente 40 minutos.

Após a electroforese, colocou-se o gel de agarose num transiluminador acoplado a uma câmara de vídeo e a um sistema informático (*BioDocAnalyze*, *Biometra*, Alemanha), onde este foi exposto a radiação UV (300 nm) para a visualização e exposição fotográfica das bandas de DNA.

9 PCR quantitativo em tempo real

O PCR em tempo real permite a amplificação de fragmentos de DNA, à medida que detecta simultaneamente a progressão da reacção de amplificação.

A detecção em tempo real dos produtos de PCR é possível a partir da inclusão na reacção de amplificação de uma molécula fluorescente que reporta um aumento da quantidade de DNA com um aumento proporcional no sinal de fluorescência. As moléculas fluorescentes utilizadas para este propósito inclui fluoróforos que se ligam ao DNA, como por exemplo, o fluoróforo *SYBR Green I* (Applied Biosystems, EUA) e sequências fluorescentes específicas de primers ou sondas, como por exemplo, sondas *TaqMan* (Applied Biosystems, EUA). Termocicladores equipados com detectores de fluorescência são usados para monitorizar a fluorescência durante o período de amplificação.

A principal vantagem do PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) em comparação com o PCR convencional é que o qRT-PCR permite determinar o número de cópias da amostra inicial com precisão.

9.1 Funcionamento do PCR quantitativo em tempo real

Na figura que se segue apresenta-se um gráfico que representa a amplificação de DNA de uma amostra por qRT-PCR (Figura II-1).

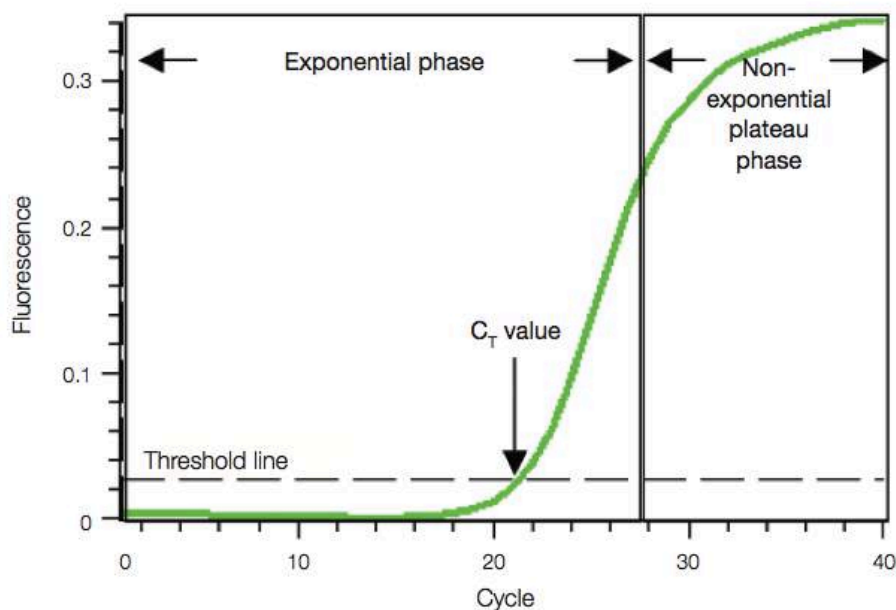


Figura II-1 – Gráfico representativo da amplificação por qRT-PCR (adaptado de *Real-Time PCR Applications Guide*)

Como se pode verificar na Figura II-1, a amplificação por qRT-PCR inclui duas fases: uma fase exponencial seguida de uma fase não exponencial. Durante a fase exponencial, a quantidade de produto de PCR duplica (aproximadamente) em cada ciclo. Contudo, durante a reacção de amplificação, os reagentes são consumidos, podendo um ou mais reagentes tornarem-se limitantes. Neste ponto, a velocidade de reacção diminui e entra na fase não exponencial (*plateau*, ciclos 28-40).

Inicialmente, a fluorescência encontra-se em níveis baixos e o aumento da fluorescência não é detectável, apesar dos produtos se acumularem exponencialmente. Esta linha de base é normalmente definida entre os ciclos 1-18. O ciclo de threshold (threshold cycle - C_T) é definido como o ponto (número de ciclos) em que a fluorescência excede essa linha de base, sendo o ciclo onde se atinge o limiar da fase exponencial. Assim, o C_T designa-se como o número de ciclos necessários para que o sinal de fluorescência exceda a linha de base. Durante a fase exponencial do PCR, a fluorescência duplica em cada ciclo. Dado que o C_T é medido na fase exponencial, em que não há limitação dos reagentes, o qRT-PCR pode ser usado com segurança e precisão para calcular a quantidade inicial de DNA presente na reacção.

O PCR quantitativo em tempo real é baseado na relação entre a quantidade inicial de amostra e o valor de C_T obtido durante a amplificação.

Uma forma de determinar se o ensaio de qRT-PCR está otimizado, apresentando eficiência e reproducibilidade adequadas, é através da construção de uma curva-padrão. Uma amostra de concentração conhecida, que expressa o gene em estudo, é diluída seriadamente, e essas diluições são utilizadas na construção de uma curva-padrão, para identificar uma relação linear entre o C_T e o logaritmo da quantidade inicial de ácido nucleico alvo na amostra padrão. A partir desta regressão linear, é possível determinar o valor de R^2 , que demonstra a linearidade dos resultados obtidos, assim como calcular a eficiência de reacção de amplificação, através da fórmula:

$$E=10^{-1/\text{declive}}$$

sendo espectável que este valor seja próxima de 2, dado que idealmente, em cada ciclo da reacção, haverá um aumento de 2 vezes do número de cópias de DNA *template*.

Desta forma, os critérios que determinam a optimização de um ensaio de qRT-PCR são:

- Curva-padrão linear ($R^2 > 0,980$ ou $r > |-0,990|$)
- Elevada eficiência de amplificação (90-105%)
- Consistência nos resultados das réplicas da reacção

Para determinar os níveis de expressão do gene de interesse relativamente a um gene de referência, podem ser utilizados diversos métodos de quantificação relativa, como por exemplo, o método Pfaffl, o método ΔC_T usando um gene de referência e o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak). No método que foi utilizado para os ensaios realizados, que foi o método $2^{-\Delta\Delta C_T}$, assume-se que tanto o gene de referência como o gene de interesse são amplificados com uma eficiência perto dos 100%. Após confirmação da referida eficiência, a diferença relativa dos níveis de expressão do gene de interesse em diferentes amostras pode ser determinada a partir da normalização dos C_T do gene de interesse em relação ao gene de referência, tanto para a amostra teste como para o calibrador (ΔC_T). Posteriormente, é normalizado o ΔC_T da amostra com o ΔC_T do calibrador ($\Delta\Delta C_T$), obtendo-se o rácio normalizado a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_T}$.

Para corrigir variações na quantidade de RNA em cada amostra, e nas eficiências das reacções de transcrição reversa e PCR, é amplificado em paralelo, para cada amostra, um controlo endógeno, ou seja, um segmento de mRNA que esteja presente em todas as amostras em estudo, em quantidade aproximadamente constante e que não seja afectada pelo tratamento experimental. Desta

forma, é usado como controlo endógeno um gene constitutivo (*housekeeping*) para o qual é também construída uma curva padrão. Para cada amostra em estudo (incluindo o calibrador), a quantidade de ácido nucleico alvo é normalizada, dividindo a quantidade obtida através da respectiva curva padrão (para o gene em estudo) pela quantidade de referência endógena ($Ct/\text{quantidade}$). Os valores de expressão relativa são por fim determinados, dividindo cada valor normalizado, relativo ao RNA alvo em cada amostra, pelo valor normalizado do calibrador.

9.2 Seleção química do PCR quantitativo em tempo real

Um importante passo para o desenvolvimento do ensaio do qRT-PCR é a selecção dos químicos para monitorizar a amplificação da sequência alvo. Os químicos fluorescentes disponíveis podem ser categorizados em dois grandes grupos: 1) Fluoróforo de ligação ao DNA (*SYBR Green I*) e 2) Sondas ou primers com sequências específicas de oligonucleótidos marcados com fluoróforos repórter (*TaqMan*, hibridização, sondas *Eclipse*, *Amplifluor*, *Scorpions*, *LUX* e primers *BD QZyme*). Os compostos mais utilizados para o PCR quantitativo em tempo real são o *SYBR Green I* e as sondas *TaqMan*.

O *SYBR Green I*, que se liga inespecificamente a DNA de dupla cadeia (Figura II-2), exibe pouca fluorescência quando se encontra livre em solução, mas a sua fluorescência aumenta quando se liga ao DNA de dupla cadeia, que é gerado durante o PCR. Assim, o sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de DNA presente, e aumenta à medida que a sequência alvo é amplificada.

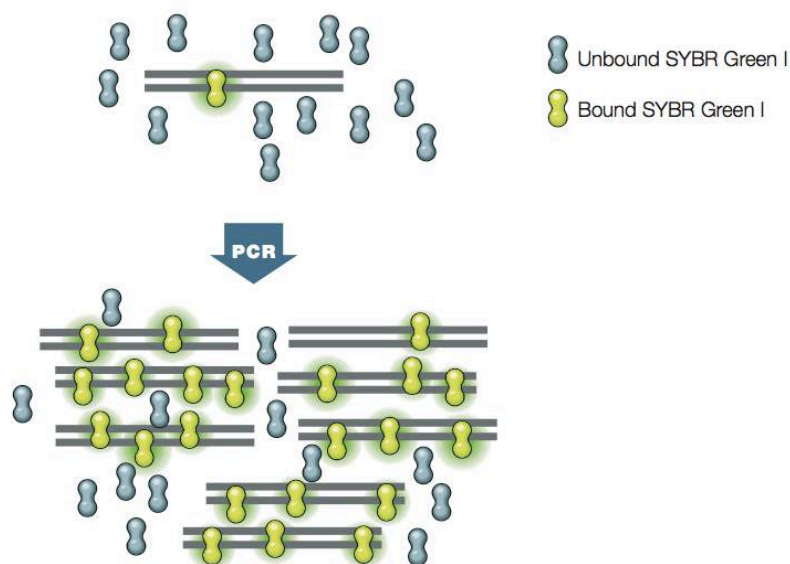


Figura II-2 – Representação esquemática do sistema *SYBR Green I* (adaptado de *Real-Time PCR Applications Guide*, Bio-Rad Laboratories, 2006)

Esta técnica foi utilizada para quantificar a expressão do gene *C8orf48* humano nas *pools* das células NIH 3T3 (Secção 3 deste capítulo) e em células TPC-1 transfectadas com o siRNA (Secção 3.3 deste capítulo). As amostras das *pools* das células NIH 3T3 foram analisadas relativamente à expressão do gene *housekeeping C8orf48* de *Mus musculus* (referência endógena), enquanto que as

amostras das células TPC-1 transfectadas com o siRNA para o gene *C8orf48* foram analisadas relativamente à expressão do gene endógeno *GAPDH*. Para construir a curva de calibração de ambos os genes endógenos foram utilizadas quatro quantidades diferentes da amostra padrão (500; 125; 31,25; 7,813 ng). Para este gene em estudo foi incluído um controlo negativo, sem cDNA (NTC – *non-template control*). As amplificações por PCR de cada amostra foram realizadas em triplicado, em placas de 96 poços (*MicroAmp Optical 96-well reaction plate*, *Applied Biosystems*).

As reacções de *SYBR Green* foram executadas seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante (*Roche Applied Science*), com algumas alterações. Primeiramente, preparou-se uma diluição de 1:4 do cDNA de cada amostra com água bidestilada estéril tratada com DEPC. Para a construção da curva de calibração preparou-se 4 diluições de log₄ (1:4, 1:16, 1:64, 1:256) partindo de uma amostra com uma concentração inicial de 2 µg/µl, perfazendo um volume de 16 µl para cada diluição. De seguida, em gelo, preparou-se para cada amostra a seguinte reacção: 2 µl da diluição do cDNA da amostra, 0,4 µl de *primer forward* e *primer reverse* (10 pmol/µl, *Sigma-Aldrich*) (Anexos, Tabelas VII e VIII) e 10 µl de *LightCycler^R 480 SYBR Green I Master 2x* concentrada (que contém o fluoróforo *SYBR Green I*, dNTPs, *FastStart Taq DNA Polimerase*, tampão de reacção e MgCl₂; *Roche Applied Science*). As reacções de qRT-PCR foram iniciadas com uma desnaturação a 95°C durante 10 minutos, que foi seguida de 35 ciclos de amplificação. Em cada ciclo ocorreu um passo de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, um passo de hibridação dos *primers* a 60°C durante 30 segundos, e um passo de extensão dos *primers* a 72°C durante 15 segundos. O PCR quantitativo em tempo real foi realizado no *LightCycler^R 480 Instrument II* (*Roche Applied Science*) e a análise dos resultados foi realizada utilizando o *software LightCycler^R 480 SW 1.5* (*Roche Applied Science*).

10 Western Blot

A técnica de Western blot permite a detecção, com anticorpos específicos, de proteínas num extracto proteico. As proteínas presentes no lisado são separadas pelo seu tamanho molecular, usando a técnica SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-poliacrilamye gel electrophoresis*). As proteínas são transferidas para um suporte sólido, normalmente um suporte de nitrocelulose ou de PVDF (*polyvinylidene difluoride*) devido às suas propriedades hidrofóbicas que os tornam no suporte ideal para a ligação de proteínas em aplicações de Western blot. Posteriormente, a partir da utilização de anticorpos específicos para a proteína (anticorpos primários), reconhecidos por anticorpos secundários conjugados com uma enzima, é possível detectar a proteína de interesse. Os anticorpos secundários são normalmente conjugados com a enzima *horseradish peroxidase* que permite catalisar uma reacção de quimioluminescência que produz um sinal, permitindo a visualização da localização da proteína de interesse na membrana.

Esta técnica permite a quantificação relativa de uma proteína particular presente em diferentes amostras. Neste sentido, usou-se esta técnica para monitorizar e quantificar a expressão da *C8orf48* (37 kDa) em *pools* transfectadas de HeLa, PCCL3 e NIH 3T3. As variantes da proteína transfectada foram detectadas usando um anticorpo específico para o epítipo *c-myc tag* presente na região c-terminal da *C8orf48*. A expressão da β -catenina de murganho (92 kDa) também foi analisada para

avaliar os efeitos das variantes da *C8orf48* na expressão desta proteína. Para corrigir variações na quantidade de amostra, foi utilizado um controlo endógeno, ou seja, uma proteína que estava presente em todas as amostras em estudo, em quantidade aproximadamente constante, e que não seja afectada pelo tratamento experimental. Para analisar os níveis de expressão da β -catenina de murganho, foi utilizado como controlo endógeno a β -actina de murganho (42 KDa).

Para obter os extratos proteicos, células foram transferidas para placas de 8,5 cm² (35 mm) e após atingirem uma confluência de 80-90%, foram lavadas com PBS (-Mg²⁺/Ca²⁺; *GIBCO™*), adicionando-se depois o tampão de lise (Anexos, Tabela X) (100 μ l/1x10⁶ células). Posteriormente, os lisados foram transferidos para tubos *ependorf* de 1,5 ml e incubados a 95°C durante 10 minutos para desnaturar as proteínas, e por fim, foram armazenados a -20°C.

Quantidades idênticas de extracto proteico (~17 μ l) foram a separados num gel de SDS-PAGE a 10% (p/v) (20 mA, 1 hora, Anexos, Tabela X) assim como um marcador de peso molecular foi utilizado (*Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Standards*; BIO-RAD) para estimar a localização esperada da banda da proteína de interesse (~8 μ l). As amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF (*Polyvinylidene flouride*; BIO-RAD), utilizando o aparelho *Mini Trans-Blot® Electroforetic Transfer Cell* (BIO-RAD), a 70V durante 2 horas, em tampão blot (Anexos, Tabela X).

As proteínas transferidas para a membrana PVDF foram marcadas com azul de *Coomassie* (*Sigma-Aldrich*), para monitorizar a eficiência de transfeção e de seguida, a mesma membrana foi incubada em solução *Destain* (Anexos, Tabela X) durante 20 minutos para tornar o azul de *Coomassie* solúvel, e lavada 3 vezes com agitação em TBST (Anexos, Tabela X).

Para prevenir ligações inespecíficas proteína-anticorpo na membrana, esta foi incubada durante 40 minutos numa solução TBST *milk* (Anexos, Tabela X). As membranas foram seguidamente incubadas com o anticorpo primário monoclonal *mouse anti- β -catenina* (*clone*, *Sigma*) numa diluição de 1:500 e anticorpo monoclonal *mouse anti-myc tag* (*clone 9E10*, *Sigma*) numa diluição de 1:2000. A diluição do anticorpo monoclonal *mouse anti- β -actina* utilizada foi de 1:10000 (controlo). Estas incubações foram realizadas em TBST *milk* (Anexos, Tabela X) *overnight* num volume total de 10 ml, em tubos *falcon* de 50 ml, *sob* agitação, a 4°C. Para a detecção da proteína, usou-se o anticorpo secundário *peroxidase-conjugated anti-mouse IgG* (*Thermo*) numa diluição de 1:5000. As incubações com o anticorpo secundário foram feitas em solução TBST *milk* (Anexos, Tabela X) durante 1 hora, com agitação, à temperatura ambiente.

As bandas proteicas imunoreativas foram detectadas por quimioluminescência usando a solução ECL (Anexos, Tabela X), seguida de exposição e aquisição da imagem no *ChemiDoc XRS System* (BIO-RAD). As imagens obtidas foram analisadas usando o software *ImageJ*.

11 Ensaio de Proliferação Celular

11.1 Contagem directa em hemocitómetro

Ensaio de proliferação foram realizados com o objectivo de avaliar o impacto da expressão do gene *C8orf48* exógeno com a variante c.65C>T no crescimento das células NIH 3T3.

Para a contagem directa de células NIH 3T3 em hemocitómetro, plaquearam-se 7×10^4 células em placas de $21,2 \text{ cm}^2$ (60mm) (*VWR International*) em meio DMEM suplementado com 1x L-Glutamina (*GIBCO™*,EUA) e NCBS a 10% (*GIBCO™*,EUA). Após 8 horas de incubação das placas na estufa a 37°C , em ambiente 5% de CO_2 , substituiu-se o meio para meio DMEM suplementado com 0,5% NCBS (*GIBCO™*,EUA) e 1x L-Glutamina (*GIBCO™*,EUA), para as células ficarem em *starvation* durante a noite. Neste período, há uma redução da actividade basal celular e as células entram em fase G0/G1, o que permite a sincronização do ciclo celular, (Pirkmajer S e Chibalin AV, 2011). A estimulação da proliferação celular, após o período de *starvation*, é induzida pela mudança para meio DMEM suplementado com 5% NCBS (*GIBCO™*,EUA) e 1x L-Glutamina (*GIBCO™*,EUA).

Os ensaios foram realizados em triplicado. A proliferação celular foi analisada por contagem de células às 0 horas (T0), 48 horas (2 dias), 72 horas (3 dias), 96 horas (4 dias) e 120 horas (5 dias).

Às 0 horas do ensaio de proliferação (T0), as células foram recolhidas e contadas de acordo com o protocolo que se segue: removeu-se o meio de cultura e lavaram-se as células uma vez com 2 ml de PBS(- $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, *GIBCO™*). Após remover o PBS (- $\text{Mg}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, *GIBCO™*) adicionaram-se 200 μl de tripsina e incubou-se durante 5 minutos, a 37°C . Neutralizou-se a tripsina com 285 μl de meio DMEM com 5% NCBS (*GIBCO™*,EUA) e transferiu-se a suspensão celular para um tubo de 1,5 ml. Adicionou-se ao tubo 15 μl de azul de tripano (*stock*) e homogeneizou-se a suspensão celular. O azul de tripano cora as células não viáveis de azul quando observadas ao microscópio, enquanto que as células viáveis não são coradas (Stoddart, 2011). As células viáveis possuem membranas intactas e não incorporam o corante do meio envolvente. Por outro lado, as células não viáveis não possuem uma membrana intacta e funcional sendo permeáveis ao azul de tripano (Stoddart, 2011). Após a entrada do corante nas células, o azul de tripano atravessa o invólucro nuclear e fixa-se nos núcleos, que ficam corados de azul.

Transferiram-se 10 μL de suspensão celular para um hemocitómetro (0,100 mm, *Neubauer Improved*) e contaram-se as células viáveis (refringentes) (Figura II-3).

A concentração celular (n° de células por mL) foi determinada pela fórmula:

$$N^\circ \text{ médio de células contadas} \times \text{factor de diluição} \times 10^4$$

Ao valor obtido, multiplicou-se o volume de suspensão celular para calcular o número total de células.

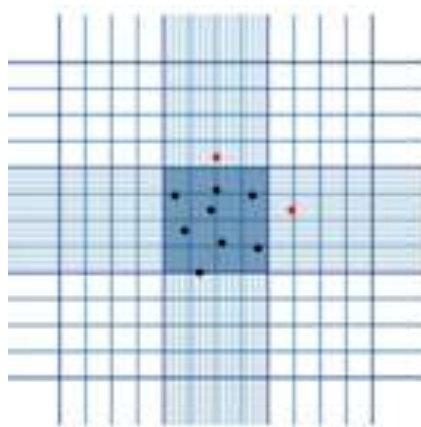


Figura II-3 -Representação de um hemocítmetro. A preto encontram-se representadas as células que se contam e a vermelho as células que não se contam (adaptado de: http://sfiles.crg.es/protocols/cellculture/img/neubauer.jpg/image_view_fullscreen).

12 Ensaio de Wound Healing

Os ensaios de Wound Healing *in vitro* são ensaios utilizados para estudar a migração celular *in vitro*. Este método reproduz, de certa forma, a migração celular durante o processo de cicatrização de feridas *in vivo*, assim como permite estudar os efeitos das interações célula-matriz e célula-célula durante a migração celular (Lee e Kay, 2006).

As células NIH 3T3 transfectadas estavelmente com os vectores pcDNA3NeoMyc, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT foram plaqueadas em placas de 8,5 cm² (35mm) marcadas com um traço horizontal (Figura II-4), a uma concentração de $2,5 \times 10^5$ células por placa e mantidas em meio DMEM complementado com 10% NCBS (GIBCOTM, EUA) e 1x L-Glutamina (GIBCOTM, EUA). Quando as células atingiram uma confluência de 90-100%, foram tratadas com Mitomicina (5 µg/mL) (Sigma-Aldrich), um potente inibidor do ciclo celular, em meio DMEM sem soro. Após o período de incubação de 4 horas com o meio DMEM sem soro e com mitomicina, realizou-se um *scratch*, isto é, uma ferida com uma ponta de micropipeta de 200 µl estéril. Posteriormente, foi removido o meio da placa, o qual continha detritos celulares suspensos e o meio suplementado com 10% NCBS e 1x-LGlutamina foi repostado na placa e as células foram incubadas numa estufa a 37°C (NuairTM US Autoflow CO₂ Water-Jacketed Incubator) num ambiente humidificado, a 5% CO₂.

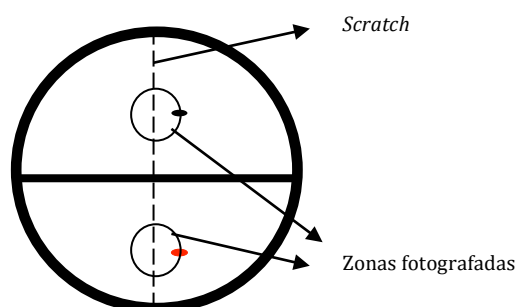


Figura II-4 - Representação esquemática da placa usada para o ensaio de wound healing.

Assinalaram-se duas regiões a fotografar, uma em cima e outra em baixo da intersecção do *scratch* com o traço previamente realizado na placa. Fotografaram-se as zonas assinaladas, em *time-points* definidos: 0h, 4h, 8h, 12h, 24h. As áreas da “ferida” foram medidas para cada região, em cada *time-point*, utilizando o *software* ImageJ.

13 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

No ciclo celular ocorre a replicação do DNA e segregação dos cromossomas replicados em duas células separadas. O ciclo celular subdivide-se nas fases G1, S, G2 (interfase) e M (mitose). A replicação do DNA ocorre na fase S, que é precedida pela fase G1, durante a qual a célula prepara a síntese do DNA, e seguida pela fase G2, na qual a célula prepara a divisão que se sucede. As células que se encontram na fase G1, antes de iniciarem a replicação do DNA, podem entrar no período de repouso designada por fase G0. Desta forma, o DNA que se encontra na fase G1/G0 corresponde ao DNA das células diploides; por outro lado, tanto as células em fase G2 como as que se encontram na fase M (mitóticas), possuem o dobro da quantidade de DNA da fase G1, não podendo desta forma se distinguidas pelo seu conteúdo de DNA (Nunez R, 2001).

A citometria de fluxo (FACS - *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) pode ser utilizada para analisar a proliferação celular, através da determinação das fases do ciclo celular numa população de células (Figura II-5).

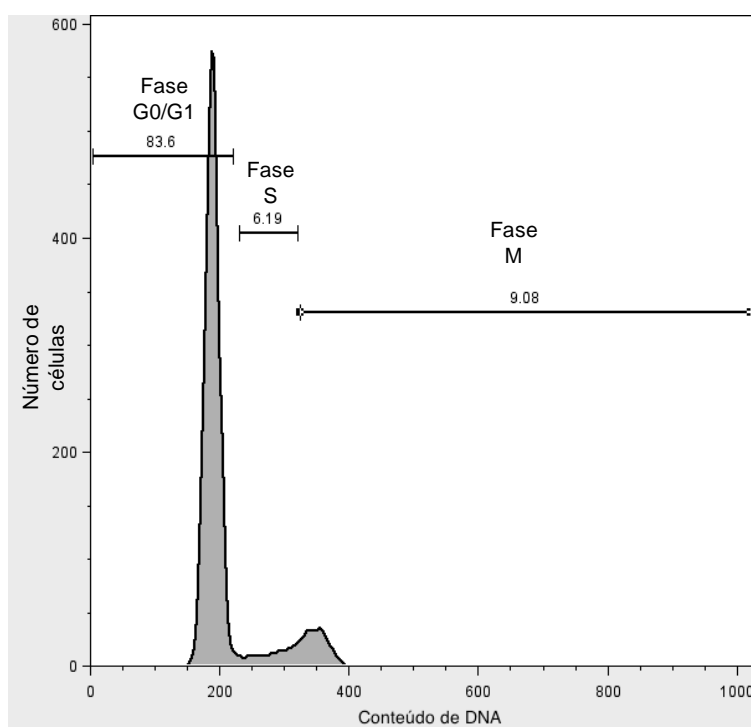


Figura II-5 – Histograma de uma das amostras analisadas (transfeção células TPC-1 com controle negativo siRNA).

Na análise do ciclo celular, as células são permeabilizadas e tratadas com iodeto de propídio (corante fluorescente) que é um agente intercalante, que se incorpora no DNA. A intensidade de fluorescência das células coradas, em comprimentos de onda específicos, correlacionam-se com a sua quantidade de DNA. Dado que a quantidade de DNA de uma célula duplica durante a fase S do ciclo celular, a quantidade relativa de células na fase G0 e G1, na fase S e nas fases G2 e M pode ser determinada, uma vez que a fluorescência das células nas fases G2/M será o dobro da das células na fase G0/G1 (Cechinni *et al.*, 2012).

Este ensaio foi realizado com células TPC-1, para estudar potenciais efeitos no ciclo celular, do silenciamento da expressão endógena do gene *C8orf48* (pela transfeção transiente do siRNA), bem como para analisar o efeito da reposição da expressão deste gene mutado e *wild type* a partir da segunda transfecção com os vectores pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT.

Para tal, seguiu-se o protocolo de transfeção e estabelecimento de *pools* descrito na secção 3.2 e 3.2.1 deste capítulo. Recolheram-se as células 24 horas depois de cada transfecção (com siRNAs e plasmídeos), começando pela lavagem das células com 1 ml de PBS ($-Mg^{2+}/Ca^{2+}$, GIBCOTM). Após a lavagem, incubaram-se as células com 500 μ l de tripsina a 37°C, durante 2 min, adicionando de seguida 750 μ l de meio puro à suspensão celular. Centrifugaram-se as células a 1200 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*; raio do rotor = 95mm) durante 3 min e descartou-se o meio. As células foram ressuspensas em 300 μ l de PBS ($-Mg^{2+}/Ca^{2+}$, GIBCOTM) e centrifugaram-se novamente as células a 1200 rpm. O sobrenadante foi eliminado e as células foram ressuspensas em 1 ml de etanol 70% (v/v) (Merck, Germany) e colocadas a 4°C, no mínimo 6h, para fixar as células e permeabilizar a membrana. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 1500 rpm (*eppendorf Centrifuge 5417C*; raio do rotor = 95mm) durante 5 minutos, o sobrenadante foi eliminado e as células foram ressuspensas em 100 μ L de solução iodeto de propídio (50 μ g/ml) (Anexos, Tabela VI) e incubadas a 37°C, durante 40 minutos. Após a incubação, foi adicionado 1 ml de PBS e as células foram centrifugadas a 1500 rpm durante 10 minutos, a 4°C (*eppendorf Centrifuge 5810R*; raio do rotor = 180 mm). O sobrenadante foi eliminado e as células ressuspensas em 150 μ l de PBS 0,2% BSA (p/v) e analisadas por citometria de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson). A aquisição foi realizada utilizando o software BD Cell QuestTM, e os histogramas do ciclo celular foram analisados a partir do programa FlowJo (Tree Star Inc.), onde as células mortas e agregadas são excluídas.

14 Análise da morte celular por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma metodologia que utiliza os princípios de dispersão de luz em partículas atravessadas por um feixe de luz, e excitação e emissão de fluorescência por fluorocromos ligados a moléculas específicas ou expressas por células, para identificar e analisar diferentes populações de células, nomeadamente, as que se encontram em apoptose/necrose ou em diferentes fases do ciclo celular (Maftah *et al.*, 1993).

A necrose é a morte permanente de células ou tecidos, causada por factores externos, como por exemplo, toxinas, hipoxia, colapso metabólico, e disrupção membranar (Dive *et al.*, 1992). A apoptose, ou morte celular programada, é uma parte integral do processo fisiológico da célula,

resultando em alterações celulares como o encolhimento e condensação do citoplasma, fragmentação da cromatina nuclear e perda da assimetria e integridade membranar, originando a exposição à superfície da fosfatidilserina (Vermes *et al.*, 2000). A fosfatidilserina pode ser detectada pela anexina V, devido à sua afinidade para esta proteína de ligação fosfolipídica (van England *et al.*, 1998). Por sua vez, o iodeto de propídio é um agente intercalante, que identifica as células necróticas pela sua ligação com os ácidos nucleicos, enquanto que as células vivas e pré-apoptóticas não são permeáveis a este composto (Rieger *et al.*, 2011).

O ensaio de morte celular foi realizado com o objetivo de avaliar a viabilidade das células TPC-1, transfectadas com siRNA para silenciar a expressão do gene *C8orf48* e com o respectivo controlo negativo do siRNA, antes e após indução da morte celular por radiação ultravioleta. Para realizar a transfecção, seguiu-se o protocolo da secção 3.2 deste capítulo. Vinte e quatro horas após a transfecção, mudou-se o meio das placas para meio RPMI 2% FBS para sincronizar o ciclo celular. Para otimizar esta técnica, 24 horas após mudança do meio das placas, quando a confluência celular era aproximadamente 100%, testaram-se 2 condições para induzir a morte: as placas com células TPC-1 transfectadas (com siRNA e controlo negativo do siRNA) foram irradiadas com radiação UV durante 2 minutos e 4 minutos, na câmara de fluxo laminar, enquanto que placas com células transfectadas com cada siRNA não foram irradiadas para controlo deste ensaio. Doze horas após a irradiação das placas, recolheu-se 2 ml de sobrenadante de cada placa para um tubo *falcon* de 15 ml. Lavou-se as placas com 500 µl de PBS 1x (-Mg²⁺/Ca²⁺, *GIBCO*TM) e após remoção do PBS, adicionou-se 200 µl de tripsina por placa, que foi neutralizada com 300 µl de meio RPMI suplementado com 10% de FBS, após um período de incubação de 5 minutos. Recolheu-se as células para os seus respetivos tubos e realizou-se uma centrifugação a 1500 rpm durante 3 minutos (*TD5A*, *Yingtai Instrument*). Eliminou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* celular com 300 µl de PBS 1x (-Mg²⁺/Ca²⁺, *GIBCO*TM) 0,2% (p/v) BSA (*Sigma*). Após centrifugação a 1500 rpm durante 3 minutos (*TD5A*, *Yingtai Instrument*) e remoção do sobrenadante, as células foram ressuspendidas em 100 µl de tampão de ligação anexina V (Anexos, Tabela VI) com 1 µl de iodeto de propídio (500 µl/ml) (*Sigma*) (Anexos, Tabela VI) e 2 µl de anexina V (50 µl/ml) (*BioLegend*, USA). Três brancos foram também preparados a partir do tampão de ligação anexina V: um branco sem iodeto de propídio e anexina V; um branco com iodeto de propídio e um branco com anexina V. Após 15 minutos de incubação no escuro, à temperatura ambiente, as células foram ressuspendidas em 100 µl de tampão de ligação anexina V e foram analisadas por citometria de fluxo (*FACScalibur* – *Becton Dickinson*). Os brancos foram usados com o objetivo de ajustar os parâmetros de aquisição das células com o software *BD Cell Quest*TM. As aquisições foram analisadas pelo software *FlowJo* (*Tree Star Inc*, USA).

15 Análise Estatística

Os dados obtidos através de vários replicados em experiências independentes foram expressos como média ± valores desvio padrão. Para analisar os resultados obtidos, utilizaram-se testes que permitissem a comparação de mais de 2 amostras independentes. Para os ensaios de proliferação e

migração utilizou-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o *post-test* de comparação múltipla de Dunn, devido ao número reduzido de ensaios.

Os dados foram analisados usando o *software* estatístico GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, EUA). Valores e $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

III RESULTADOS

1 Estudo do efeito da variante p.T22I no gene *C8orf48* na tumorigénese

No desenvolvimento deste projeto, o nosso grupo inicialmente mapeou o gene de susceptibilidade na região cromossómica 8p23.1-p22 (*FTE*) (Cavaco *et al.*, 2008b). Posteriormente, realizou-se a sequenciação global do exoma de um dos indivíduos (indivíduo II.8) da família 1 (Figura III-1), identificando uma nova variante potencialmente patogénica no gene *C8orf48* (Pereira, 2012). Esta variante (c.65C>T, p.T22I), que se encontrava em heterozigotia, foi recentemente descrita [bases de dados NCBI (<http://ncbi.nlm.nih.gov>); EMSEMBL(www.emsembl.org)], tendo sido encontrada (em heterozigotia) num indivíduo de uma população de 285 descendentes Europeus.

Para além do probando (III.14) e do indivíduo II.8, nesta família observou-se 14 outros familiares portadores da referida variante no gene *C8orf48* (II.3, II.6, II.14, II.16, II.18, II.23, III.9, III.12, III.21, III.22, III.23, III.26, III.32 e III.33), o que indicou que a variante segregava com a doença na família.

Os indivíduos portadores da variante no gene *C8orf48*: II.6, II.14, II.18, II.23, III.21, III.22, III.23 e III.26 apresentavam MNG, o indivíduo II.3 apresentava FTA, os indivíduos II.8 e III.12 apresentavam FTA e cPTC, os indivíduos II.16 e III.14 apresentavam cPTC e o indivíduo III.9 apresentava cPTC e fvPTC. Observou-se ainda que 2 familiares, os indivíduos III.25 e o III.29, apresentavam MNG, mas não eram portadores da variante no gene *C8orf48*, tratando-se possivelmente de fenocópias. Os indivíduos III.32 e III.33 eram portadores da variante, no entanto não manifestavam a doença, provavelmente, devido ao facto de ainda serem jovens.

Uma vez que esta variante não foi detectada em 50 controlos normais, não se trata assim de um polimorfismo comum na população Portuguesa.

Para averiguar se esta variante está envolvida na tumorigénese da tiróide, no projeto de Mestrado desenvolvido anteriormente neste grupo (Santos, 2013), foi realizado um estudo de haplotipos nesta família, no sentido de definir a sequência do gene *C8orf48* nos indivíduos afectados, que foi utilizada para a preparação dos vectores com a região codificante do gene *C8orf48* com e sem a variante c.65C>T (p.T22I). Na referida tese de Mestrado, foram realizados estudos funcionais preliminares, utilizando a linha celular de carcinoma papilar da tiróide (TPC-1), designadamente, ensaios de viabilidade celular, não se observando diferenças estatisticamente significativas na viabilidade das células transfectadas transitoriamente com os vectores que expressavam o gene *C8orf48* com ou sem a referida variante.

Nesta tese de Mestrado desenvolveram-se estudos de expressão da proteína C8orf48 (com e

sem a variante p.T22I), após transfecção estável e transitória de células HeLa (células humanas de carcinoma uterino), transfecção transitória de células PCCL3 (células foliculares de tiróide normal de *Rattus norvegicus*) e transfecção estável e transitória de células NIH 3T3 (células de fibroblastos embrionárias de *Mus musculus*). Subsequentemente, foram realizados ensaios de proliferação e migração celular, utilizando *pools* de células NIH 3T3, e estudos de ciclo celular e morte celular em células TPC-1, por citometria de fluxo, para estudo da função do gene *C8orf48* e do efeito da nova variante detectada neste gene.

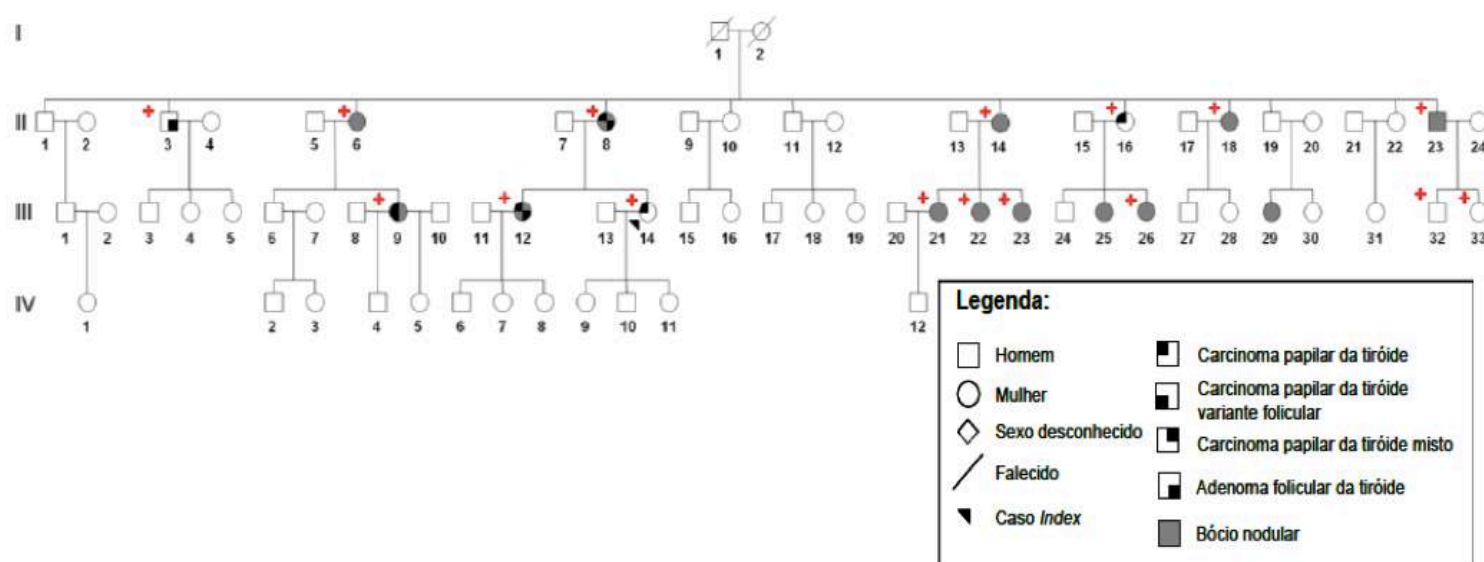


Figura III-1 - Árvore genealógica da família 1, na qual foi identificada uma nova variante (c.65C>T) no gene *C8orf48* (Pereira, 2012).

1.1 Preparação de linhas celulares tumorais e de células da tiróide com expressão transitória e estável dos vectores pcDNA3NeoMyc, pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT

Para avaliar a expressão transitória e estável dos plasmídeos: pcDNA3NeoMyc (sem o gene *C8orf48*), pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT que expressa o gene *C8orf48* *wild type* e do plasmídeo pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT que expressa o gene *C8orf48* com a variante c.65C>T (obtido por mutagénese dirigida), que é traduzido para a proteína com a alteração p.T22I, realizaram-se ensaios de Western blot para as linhas celulares tumorais HeLa, NIH 3T3, e para as células PCCL3. No texto que se segue, serão utilizadas as seguintes abreviaturas para os plasmídeos: PCDNA3 (plasmídeo pcDNA3 sem o gene *C8orf48*), WT (pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT) e MUT (pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT).

1.1.1 Linha celular tumoral HeLa

As células HeLa foram a primeira linha celular humana estabelecida em cultura (Gey *et al.*, 1952) e desde então, tornou-se na linha celular mais utilizada em investigação médica. Estas células derivam de um tumor do colo uterino da doente Henrietta Lacks (Skloot, 2010). Relativamente aos

aspectos genéticos das células HeLa, estudos recentes demonstraram que estas células apresentam: um elevado nível de aneuploidia, um aumento da ocorrência de rearranjos cromossómicos num só evento de “catástrofe celular” em determinadas regiões genómicas (fenómeno também conhecido como *cromotripsis*) (Stephens *et al.*, 2011), e um perfil de expressão génica alterado para diversos genes envolvidos nos mecanismos de controlo do ciclo celular e reparação do DNA, comparativamente com células humanas não tumorais (Landry *et al.*, 2013).

Desta forma, e uma vez que esta linha celular tumoral imortalizada apresenta células com uma rápida proliferação (John, 2002) e uma elevada eficiência de transfecção (Chen *et al.*, 1987), optou-se por utilizar inicialmente este modelo celular para estudar a expressão transitória e estável da proteína C8orf48, resultante da expressão das construções derivadas do plasmídeo PCDNA3.

As condições utilizadas nas transfecções transitórias, encontram-se descritas no ponto 3 da secção Materiais e Métodos, e as condições utilizadas na preparação das *pools* encontram-se descritas no ponto 3.1 da secção Materiais e Métodos.

Análise por Western blot dos níveis de expressão da proteína Myc-C8orf48 (WT e MUT) após transfecções transitórias e estáveis de células HeLa

As condições de preparação e realização dos Western blots indicados nas Figuras III-2-5 encontram-se descritas no ponto 10 da secção Materiais e Métodos. O número de células HeLa utilizadas para se obterem os lisados proteicos variou, sendo 3×10^5 , $3,5 \times 10^5$, 4×10^5 e $5,5 \times 10^5$ células para os Western blot das Figuras III-2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Todos os lisados resultantes da transfecção transitória dos vectores WT e MUT em células HeLa apresentaram expressão da proteína Myc-C8orf48, uma vez que se visualizou uma banda de aproximadamente 38 kDa (tamanho da proteína Myc-C8orf48 WT e MUT) no poço 1 da Figura III-2 e nos poços 1, 2 da Figura III-3, correspondente ao tamanho esperado desta proteína. Por conseguinte, estas amostras foram utilizadas como controlos positivos de todos os ensaios de Western blot subsequentes.

Dado que no plasmídeo PCDNA3 não se encontrava inserido o gene *myc-C8orf48*, seria esperado não se detectar a banda correspondente à proteína Myc-C8orf48, o que se confirmou, como se pode observar no poço 2 da Figura III-2, poço 3 da Figura III-3, poços 1 das Figuras III-4 e 5, a ausência da banda de 38 kDa.

Apesar de se ter partido de um número de células diferentes para se obter os lisados proteicos para cada Western blot apresentado nas Figuras III 2-5, não se conseguiu aumentar a expressão da proteína de interesse com o aumento do número de células, provenientes tanto de transfecções transitórias como de transfecções estáveis. Como se pode observar a partir das Figuras III-2-5, a banda mais intensa da Myc-C8orf48 corresponde ao lisado proteico proveniente da placa com menor número de células que sofreram transfecção transitória (poço 1 da Figura I-2).

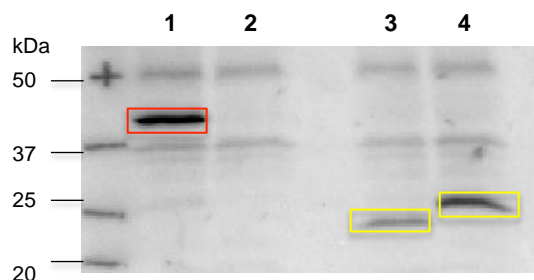


Figura III-2 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em células HeLa transfectadas transitoriamente com: 1-WT, 2-PCDNA3, 3-Myc-Rac1 (controle positivo), 4-Myc-Rac1b (controle positivo).

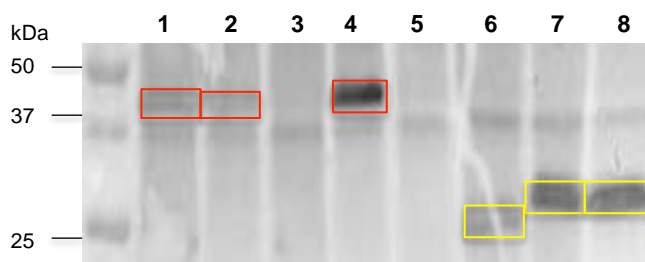


Figura III-3 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em células HeLa transfectadas transitoriamente com: 1-MUT, 2-WT, 3-PCDNA3, 4-Controle positivo (WT - lisado 1 da figura III-2), 5-PCDNA3 (lisado 2 da figura III-2), 6-Myc-Rac1 (controle positivo), 7-Myc-Rac1b (controle positivo) 8-Controle positivo (Myc-Rac1b - lisado 4 da figura III-2).

Nas *pools* das células HeLa, não foi detectada expressão da proteína Myc-C8orf48 (Figuras III-4-5). Pelo contrário, nesta análise de Western blot, detectou-se a proteína Myc-Rac1 (controle positivo) e a proteína Myc-C8orf48 nos lisados obtidos a partir da transfeção transitória destas células (controles positivos).

A proteína Myc-Rac1 (23 kDa) foi utilizada como controle positivo, observando-se a sua expressão em todos os Western blot realizados.

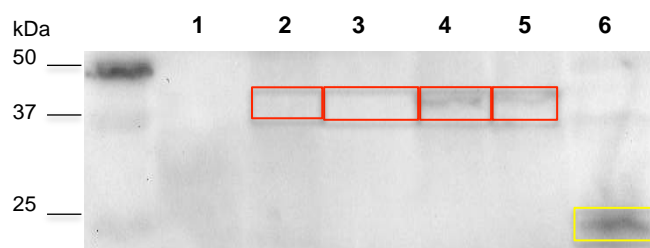


Figura III-4 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em *pools* de células HeLa transfectadas estavelmente com: 1- PCDNA3, 2 – WT, 3 – MUT, 4 - Controle positivo (WT – lisado de um ensaio de transfeção transitória em células HeLa realizado anteriormente), 5 – Controle positivo (MUT – lisado de um ensaio de transfeção transitória em células HeLa realizado anteriormente), 6 – Controle positivo (Myc-Rac1b – lisado 4 da figura I-2).

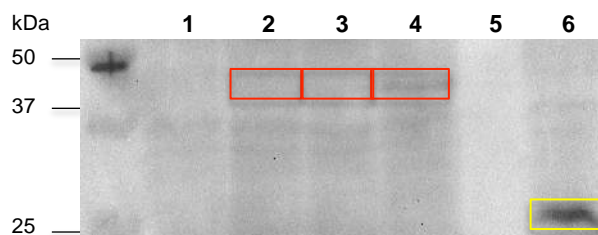


Figura III-5 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em *pools* de células HeLa transfectadas estavelmente com: 1- PCDNA3, 2 – MUT, 3 – WT, 4 – Controle positivo (MUT – lisado 5 da Figura III-4), 6 – Controle positivo (Myc-Rac1 - lisado 3 da Figura III-2).

1.1.2 Células PCCL3

Apesar de se ter obtido expressão da proteína Myc-C8orf48 nas transfecções transitórias em células HeLa, o que permitiu confirmar que a construção do plasmídeo tinha sido realizada de forma adequada para a expressão da referida proteína de interesse, dado que o objectivo deste trabalho foi estudar o efeito da variante c.65C>T do gene *C8orf48* na tumorigénese em células da tiróide, utilizou-se também o modelo celular PCCL3. Estas células são provenientes da clonagem de células foliculares de tiróide normal de *Rattus norvegicus* e são dependentes de TSH para o seu crescimento e para a expressão de genes específicos envolvidos na morfologia e diferenciação da tiróide (Fusco *et al.*, 1987).

Análise por Western blot dos níveis de expressão da proteína Myc-C8orf48 (WT e MUT) após transfecção transitória de células PCCL3

Para expressar as proteínas Myc-C8orf48 WT em células PCCL3 (Figuras III-6-7), foram testadas diferentes condições na transfecção transitória destas células, de acordo com o protocolo descrito no ponto 3 da secção Materiais e Métodos.

Os lisados resultantes da transfecção transitória de células PCCL3 com o plasmídeo WT, utilizando diversas condições de transfecção (poços 2, 4, 6 e 8 da Figura III-6) apresentaram uma reduzida expressão da proteína Myc-C8orf48 WT, dado que as bandas de 38 kDa que correspondiam a esta proteína tinham uma intensidade muito fraca. Entre as bandas fracas, as que eram um pouco mais intensas, da proteína MyC-C8orf48 WT (poços 6, 8 da Figura III-6) e da proteína Myc-Rac1b (poços 7 e 9 da Figura III-6), foram obtidas com lisados resultantes de uma transfecção transitória em que se utilizaram 4 µg de DNA e 8 µl de lipofectamina, em 10×10^5 células PCCL3 (condição 6 da Tabela IV). Optou-se por repetir o Western blot, com novos lisados obtidos nestas últimas condições (Figura III-7), no entanto, o resultado deste novo ensaio foi idêntico ao anterior, uma vez que se continuava a observar bandas pouco intensas, tanto para a proteína Myc-C8orf48 WT (poço 2 da _Figura III-7) como para a proteína Myc-Rac1b (poço 4 da Figura III-7).

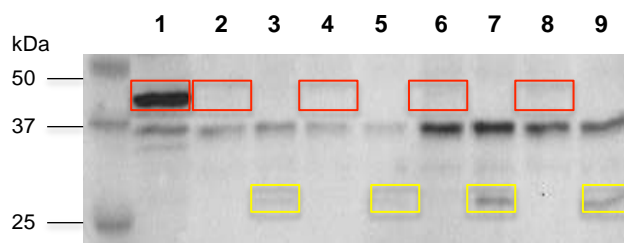


Figura III-6 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em células PCCL3 transfectadas transitoriamente com: 1 – Controlo positivo (WT – lisado 1 da Figura III-2), 2 – WT (condição 3 da Tabela IV), 3 – Myc-Rac1b (controlo positivo – condição 3 da Tabela IV), 4 – WT (condição 4 da Tabela IV), 5 – Myc-Rac1b (controlo positivo – condição 4 da Tabela IV), 6 – WT (condição 5 da Tabela IV), 7 – Myc-Rac1b (controlo positivo – condição 5 da Tabela IV), 8 – WT (condição 6 da Tabela IV), 9 – Myc-Rac1b (controlo positivo – condição 6 da Tabela IV).

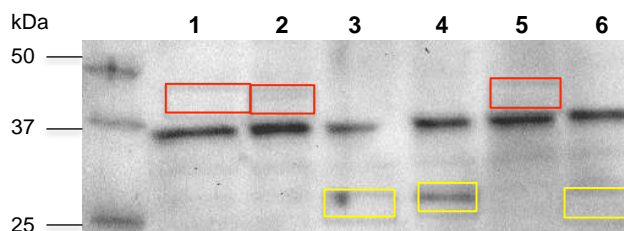


Figura III-7 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em células PCCL3 transfectadas transitoriamente com: 1 – WT (condição 6 da Tabela IV), 2 – WT (condição 6 da Tabela IV), 3 – Myc-Rac1b (controlo positivo – condição 6 da Tabela IV), 4 – Myc-Rac1b (controlo positivo – condição 6 da Tabela IV), 5 – Controlo positivo (WT – lisado 8 da Figura III-6), 6 – Controlo positivo (Myc-Rac1b – lisado 9 da Figura III-6).

Uma vez que estes ensaios foram realizados para otimizar as condições de detecção da expressão da proteína Myc-C8orf48, optou-se por transfectar inicialmente apenas o vector pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT. No entanto, como se obteve uma baixa expressão da proteína Myc-C8orf48 a partir das diversas condições de transfecções transitórias testadas e dado que foram células de difícil manuseamento/propagação, optou-se por não se estabelecer *pools* a partir das células PCCL3. Em alternativa, tentou-se obter a expressão da referida proteína numa linha celular tumoral da tiróide (TPC-1) e de uma linha celular embrionária de fibroblastos de ratinho (NIH 3T3).

1.1.3 Linha celular tumoral TPC-1

Uma linha celular de carcinoma papilar da tiróide humana (PTC) foi estabelecida pela primeira vez em 1989 (Ishizaka *et al.*, 1989), e foi designada por TPC-1. Esta linha celular, apresenta um rearranjo *RET/PTC1* (Kondo *et al.*, 2006) e um polimorfismo no gene *HRAS* (His27His) (Meireles *et al.*, 2007).

Análise por Western blot dos níveis de expressão da proteína Myc-C8orf48 após transfecção estável de células TPC-1

Em *pools* de células TPC-1, obtidas após transfecção estável do vector WT e MUT, não foi detectada a proteína Myc-C8orf48 WT e MUT (38 kDa) por Western blot, tendo no entanto sido detectada a proteína Myc-Rac1 (23 kDa) (controlo positivo) (resultados não publicados, obtidos anteriormente pela Doutora Ana Morgado do grupo de Endocrinologia Molecular da Unidade de Investigação de Patobiologia Molecular/ IPO-Lisboa).

1.1.4 Linha celular tumoral NIH 3T3

Dado que a expressão da proteína Myc-C8orf48 nas células PCCL3 e TPC-1, respectivamente, era muito reduzida ou nula, optou-se por analisar ainda um outro modelo celular, as células NIH 3T3.

Em 1962, isolou-se pela primeira vez uma linha celular embrionária de fibroblastos de ratinho (*Mus musculus*), também designada por NIH 3T3, que foi obtida a partir de fibroblastos desagregados de murganhos *NIH Swiss*. Estas células foram seleccionadas porque, para além de serem imortalizadas, quando transformadas a partir da integração de um gene com potencial oncogénico, exibem um fenótipo tumoral, como por exemplo, aumento da proliferação, migração, perda de inibição por contacto e crescimento em focos (Simons *et al.*, 1967).

As condições utilizadas na transfecção transitória encontram-se descritas no ponto 3 da secção Materiais e Métodos, e as condições utilizadas na preparação das *pools* encontram-se descritas no ponto 3.1 da secção Materiais e Métodos.

Análise por Western blot dos níveis de expressão da proteína Myc-C8orf48 (WT e MUT) após transfecções transitórias e estáveis de células NIH 3T3

Não foi detectada expressão da proteína Myc-C8orf48 WT ou MUT nos lisados resultantes, quer da transfecção transitória das células NIH 3T3 com os vectores PCDNA3, WT e MUT, quer das transfecções estáveis - *pools* PCDNA3, WT e MUT de células NIH 3T3, uma vez que não se visualizou em qualquer dos casos a banda de 38 kDa correspondente à proteína de interesse, nos diferentes Western blots realizados (Figuras III-8-10).

A detecção da banda correspondente à proteína Myc-Rac1 (controlo positivo) de aproximadamente 23 kDa (poços 5, 1 e 5 das Figuras III-8,9 e 10, respectivamente) indica que a ausência de detecção da expressão da proteína Myc-C8orf48 WT e MUT não resultou de problemas técnicos na execução da técnica do Western blot.

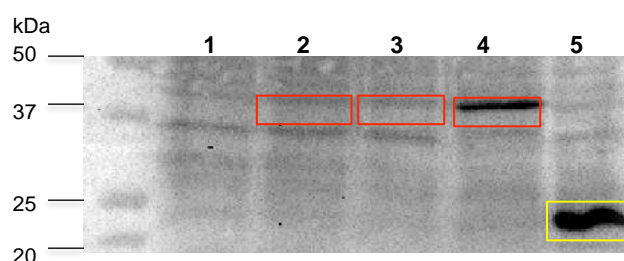


Figura-III-8 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em células NIH 3T3 transfectadas transitoriamente com: 1 – PCDNA3, 2 – MUT, 3 – WT, 4 – Controlo positivo (WT – lisado 2 da Figura III-3), 5 – Controlo positivo (Myc-Rac1 – lisado 3 da Figura III-2).

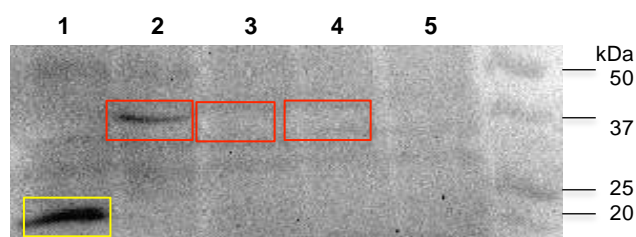


Figura-III-9 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em células NIH 3T3 transfectadas transitoriamente com: 1 – Controlo positivo (Myc-Rac1 – lisado 3 da Figura III-2), 2 – Controlo positivo (WT – lisado 1 da Figura III-2), 3 – WT, 4 – MUT, 5 – PCDNA3.

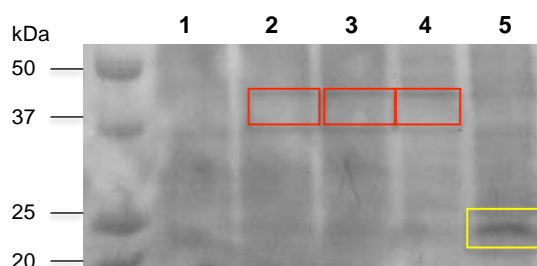


Figura III-10 – Análise da expressão da proteína Myc-C8orf48 por Western blot em pools de células NIH 3T3 com: 1- PCDNA3, 2 – MUT, 3 – WT, 4 – Controlo positivo (MUT - lisado 5 da Figura III-4) , 5 - Controlo positivo (Myc-Rac1 – lisado 3 da Figura III-2).

1.2 Estudos funcionais da variante p.T22I (c.65C>T) do gene *C8orf48* em pools de células NIH 3T3

Apesar de não se ter observado expressão da proteína Myc-C8orf48 nas *pools* das linhas celulares analisadas, havia evidência da expressão dos transcritos MUT e WT por RT-PCR (não-quantitativo), desta forma, optou-se por avançar nos estudos funcionais da variante p.T22I (c.65C>T) do gene *C8orf48*. Para avaliar o efeito desta variante, realizaram-se ensaios *in vitro*, utilizando *pools* das células NIH 3T3. Estas células, embora não derivem da tiróide, constituem um modelo facilmente transformável sob efeito oncogénico, sendo desta forma adequadas para os estudos iniciais de genes cujo efeito na tumorigénese é ainda desconhecido.

1.2.1 Quantificação dos níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* humano nas pools de células NIH 3T3

Para quantificar o nível de expressão relativa do gene *C8orf48* (WT e MUT), extraiu-se RNA das *pools* NIH 3T3, para síntese do cDNA e análise por qRT-PCR.

Os níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* (WT e MUT) nas várias amostras foram normalizadas em relação aos níveis de expressão do gene *C8orf48* (controlo endógeno) (Figura III-11).

As *pools* de células TPC-1 transfectadas com o plasmídeo MUT apresentaram um nível de expressão relativo do gene *C8orf48* exógeno aproximadamente 2x superior (embora com um desvio padrão elevado) ao das *pools* transfectadas com o plasmídeo WT (Figura III-11). Os níveis de expressão relativos para as células transfectadas com o plasmídeo PCDNA3 foram praticamente nulos, o que seria expectável dado que o gene de interesse não se encontra inserido nesse plasmídeo (Figura III-11).

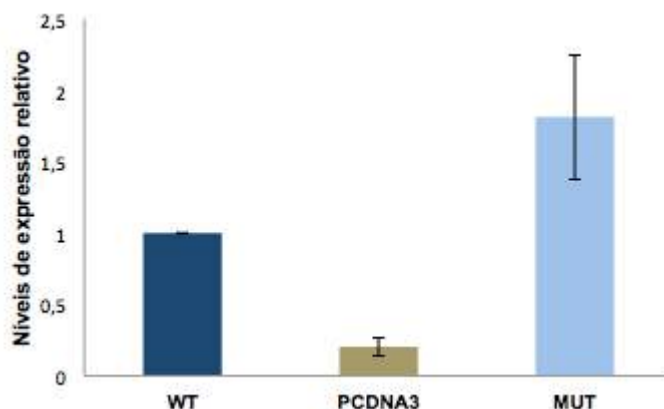


Figura III-11 - Níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* nas *pools* transfectadas com os plasmídeos WT, MUT e PCDNA3. Os níveis de expressão do gene *C8orf48* exógeno foram determinados por qRT-PCR e normalizados em relação aos níveis de expressão do gene *C8orf48* endógeno. Os níveis de expressão do gene *C8orf48* foram analisados em relação ao WT. Os valores apresentados correspondem à média de triplicados.

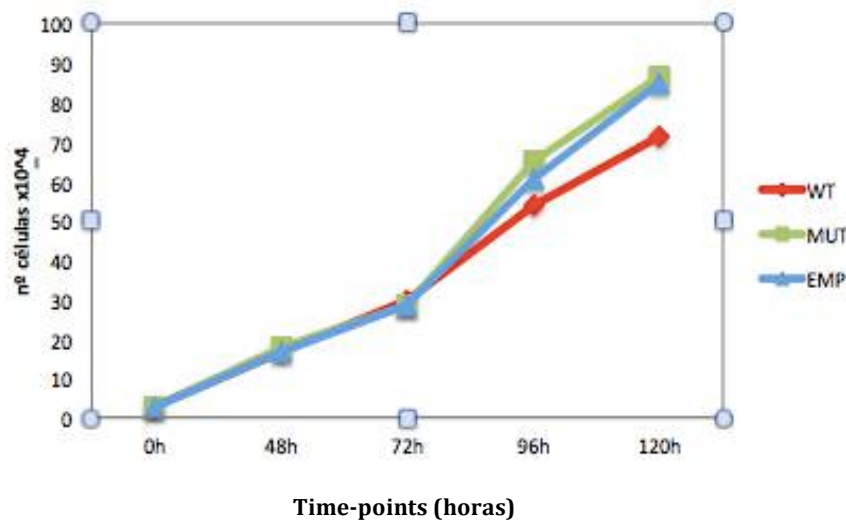
1.2.2 Ensaios de proliferação celular com pools de células NIH 3T3

Neste estudo, avaliou-se a capacidade proliferativa das *pools* de células NIH 3T3 transfectadas de forma estável com os plasmídeos PCDNA3, WT, MUT, por contagem directa de células em hemocitómetro nos *time points* 0, 48, 72, 96 e 120 horas.

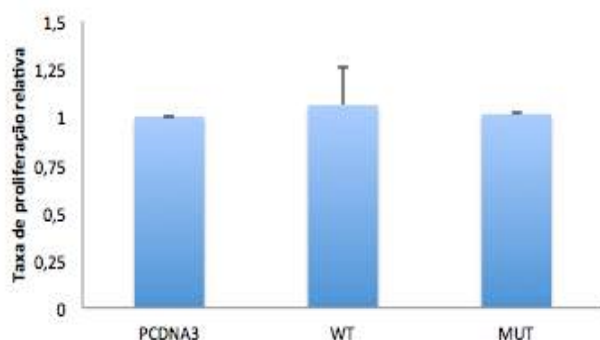
O protocolo seguido para realizar este ensaio encontra-se descrito na secção 11 dos Materiais e Métodos.

As três *pools* apresentaram um número de células (Figura III-12A) e taxas de proliferação relativa (em relação ao controlo - *pool* PCDNA3) (Figura III-12B, 12C, 12D, 12E e 12F) muito semelhantes em cada *time-point* estudado, não apresentando diferenças estatisticamente significativas ($P > 0,05$).

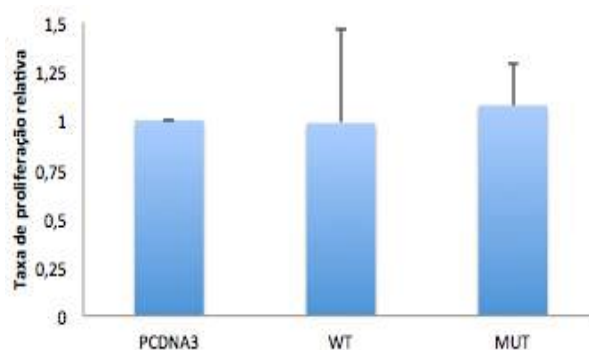
A



B



C



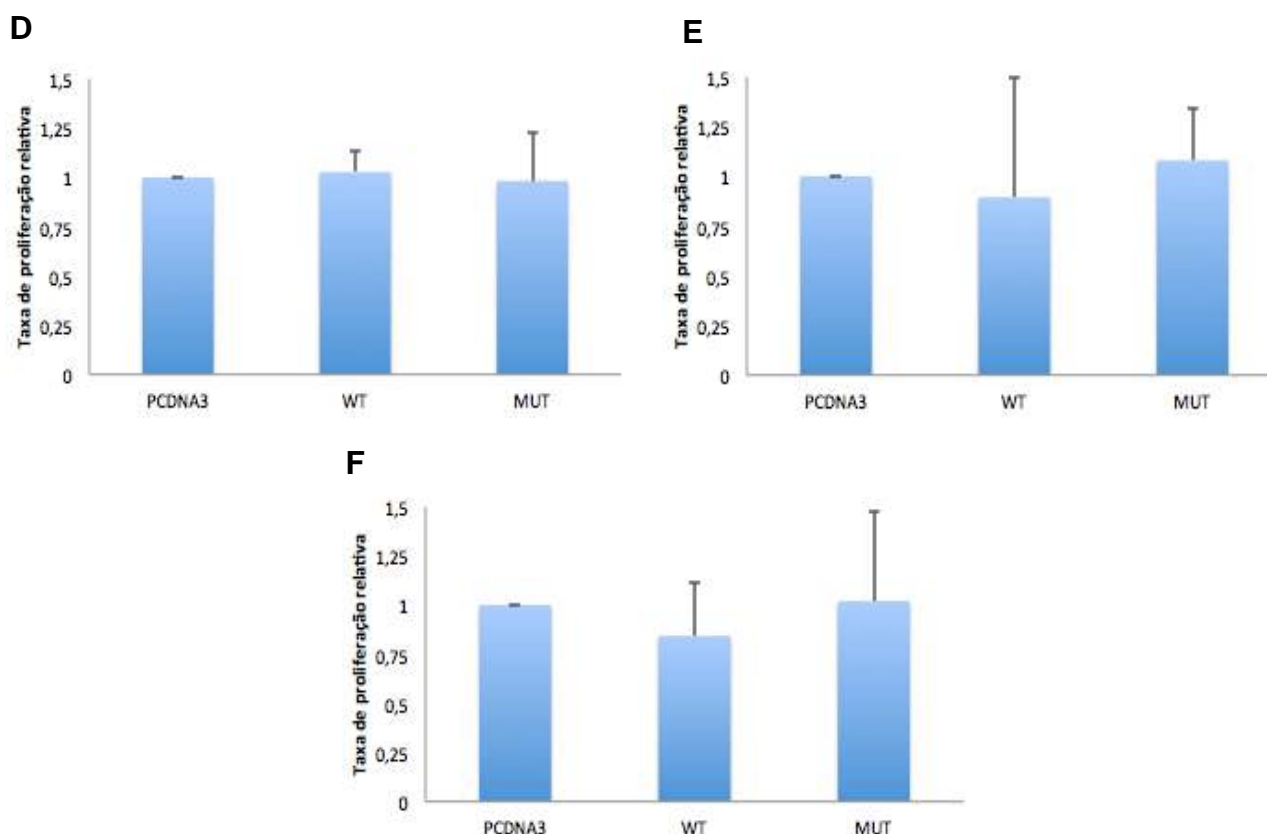


Figura III-12 – Estudo do efeito da variante p.T22I no gene *C8orf48* na proliferação celular. (A) Ensaio de proliferação celular para as *pools* de células NIH 3T3: PCDNA3, WT e MUT, por contagem directa em hemocitómetro nos *time-points* 0 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas e 120 horas. Taxas de proliferação de *pools* de células NIH 3T3, relativas ao PCDNA3, às 0 horas (B), 48 horas (C), 72 horas (D), 96 horas (E) e 120 horas (F). As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 9 replicados, em 3 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o *post-test* de comparação múltipla de Dunn.

Estes resultados sugerem que a variante p.T22I no gene *C8orf48* não promove a proliferação, neste modelo celular.

1.2.3 Ensaios de migração celular com *pools* de células NIH 3T3

Neste trabalho, estudou-se a capacidade de migração das três *pools* celulares (PCDNA3, WT, MUT), através da análise da capacidade de reparação de uma lesão (*scratch*) realizada na monocamada de células, nos *time-points* 4h, 8h e 12h (ensaio de *wound-healing* – secção 12 dos Materiais e Métodos).

As três *pools* apresentaram uma capacidade de reparação da área lesada da monocamada de células similar em todos os *time-points*, dado que a percentagem da área ocupada da lesão era muito semelhante nas diferentes *pools* (Figura III-13A). Analogamente, as taxas de migração relativa (em relação ao controlo (*pool* PCDNA3) para os diferentes *time-points* não apresentaram diferenças estatisticamente significativas (Figura III-13B, 13C e 13D).

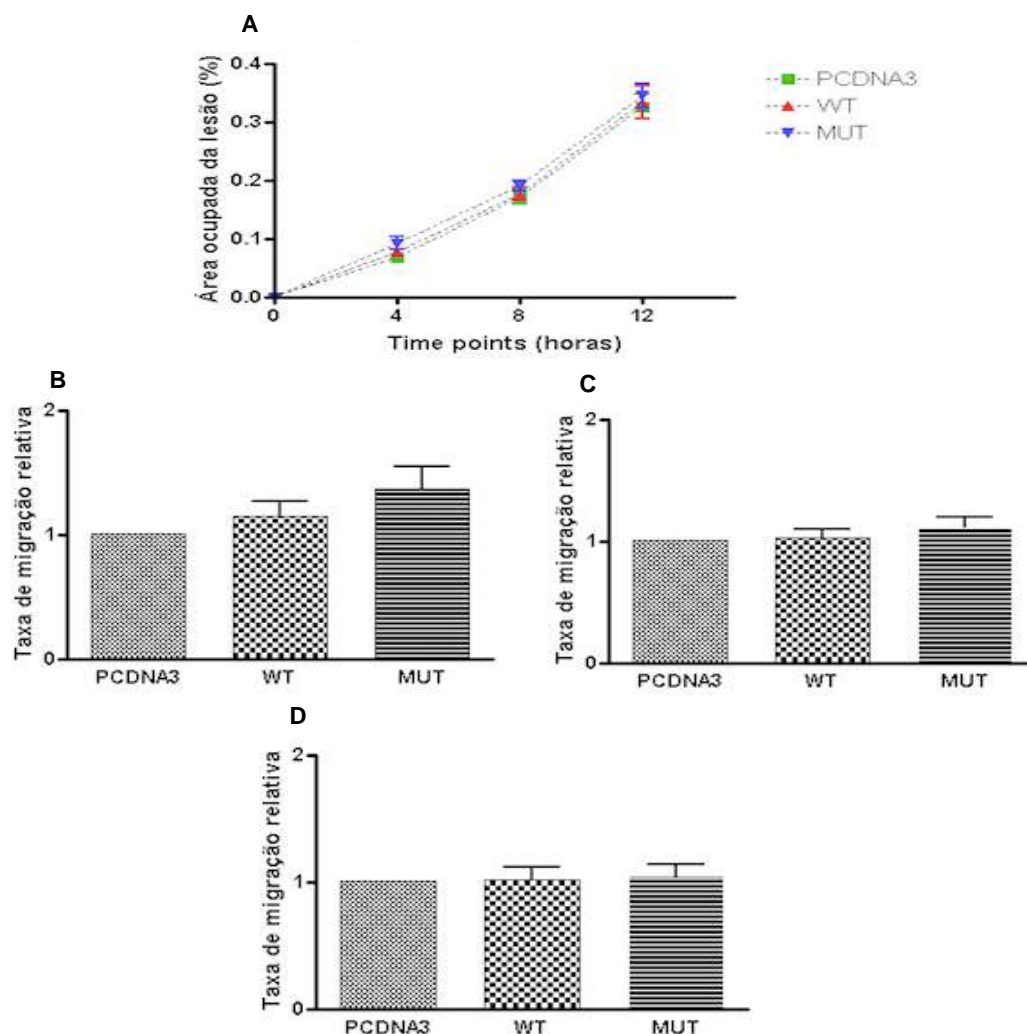


Figura III-13 – Estudo do efeito da variante p.T221 no gene *C8orf48* na migração celular. (A) Análise da migração celular através de ensaio de *wound healing*. A área ocupada da lesão (%) nas *pools* de células TPC-1: pcDNA3, WT e MUT foi determinada nos *time-points* 0h, 4h, 8h e 12h. Taxa de migração relativa das 3 *pools* nos *time-points* 4h (B), 8h (C) e 12h (D). A área ocupada da lesão foi calculada através da razão entre a área em cada *time-point* e a área inicial (percentagem). As áreas foram determinadas utilizando o *software* ImageJ. As barras de erro indicam o desvio padrão. Valores correspondentes à média de 16 replicados, em 3 ensaios independentes. Os dados foram analisados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e o *post-test* de comparação múltipla de Dunn.

Estes resultados sugerem que a variante p.T221 no gene *C8orf48* não promove a migração neste modelo celular.

1.2.4 Estudo da expressão da proteína β -catenina endógena em *pools* de células NIH 3T3

Dado que a única informação disponível até ao momento sobre a função da proteína C8orf48 é a sua interação com a proteína MDFI e uma vez que esta proteína está envolvida na degradação ou estabilização e acumulação de β -catenina livre no citoplasma, analisou-se por Western blot os níveis de expressão da proteína β -catenina endógena (92 kDa) nas diferentes *pools* de NIH 3T3 (PCDNA3, WT e MUT) (Figura III-14).

As *pools* MUT e WT apresentaram uma expressão da β -catenina superior à da *pool* PCDNA3 (controlo) (Figura III-15). Apesar de se observar esta tendência, será necessário repetir esta quantificação, em condições idênticas, mas a partir de lisados obtidos a partir de diferentes passagens das *pools* celulares.

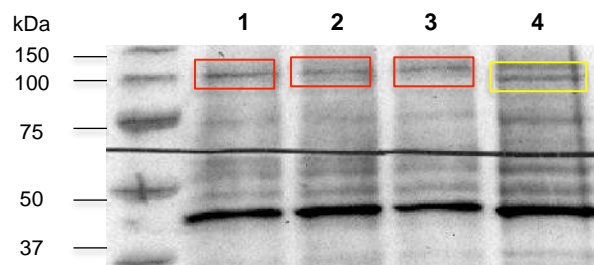


Figura III-14 - Análise da expressão da proteína β -catenina (92 kDa) por Western blot em *pools* de células NIH 3T3 com: 1-WT, 2 – PCDNA3, 3 – MUT, 4 – Controlo positivo (*pool* células HeLa PCDNA3).

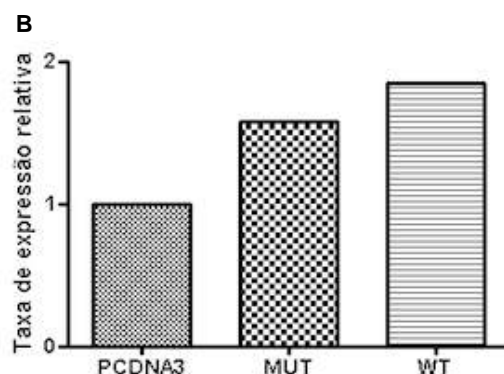


Figura III-15 – Taxa de expressão relativa da proteína β -catenina nas 3 *pools* de células NIH 3T3 (PCDNA3, WT, MUT). A expressão da proteína β -catenina foi calculada através da razão entre a área da banda correspondente à proteína β -catenina e a área da banda correspondente à proteína β -actina em cada Western blot (percentagem). A expressão relativa foi calculada em relação ao controlo (*pool* PCDNA3) As áreas foram determinadas utilizando o *software* ImageJ.

1.3 Estudo do efeito do silenciamento do gene *C8orf48* endógeno em células TPC-1

Dado que nos estudos anteriores não foram encontradas evidências do envolvimento do gene *C8orf48* quer na proliferação ou migração celular, no modelo celular NIH 3T3, optou-se por investigar qual o papel deste gene numa linha tumoral de tiróide (TPC-1), através do seu silenciamento.

A interferência da expressão genética por siRNA (*small interfering RNA*) é reconhecida como uma estratégia natural da célula para silenciar genes durante o desenvolvimento de plantas, invertebrados e vertebrados. Em cultura de células animais, a redução da expressão genética mediada por siRNA é conseguida a partir da transfecção de oligonucleótidos sintéticos de RNA, desde que apresentem um tamanho inferior a 30 pares de base, para garantir uma elevada especificidade para o gene alvo em estudo (Xia et al., 2002).

Para investigar o efeito do silenciamento do gene *C8orf48* endógeno, a partir da transfecção transiente do siRNA-*C8orf48* (e respectivo controlo negativo) em células TPC-1 (condições de

transfecção descritas na secção 3.1 dos Materiais e Métodos), realizaram-se ensaios de ciclo celular e morte celular por citometria de fluxo (FACS).

1.3.1 Quantificação dos níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* endógeno humano após transfecção transitória de células TPC-1 com siRNA

Para quantificar o nível de expressão relativa do gene *C8orf48*, após transfecção transitória de células TPC-1 com o siRNA-*C8orf48* e respectivo controlo negativo (siRNA-), extraiu-se RNA destas células para síntese do cDNA e análise por qRT-PCR.

Os níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* nas várias amostras foram normalizadas em relação aos níveis de expressão do gene *GAPDH* (controlo endógeno) (Figura III-16).

As células TPC-1 transfectadas com o siRNA-*C8orf48*, dirigido ao gene endógeno *C8orf48*, apresentaram, após 24h, uma redução de expressão do gene alvo de aproximadamente 30%, relativamente às células transfectadas com o siRNA-, enquanto que 48 horas após a transfecção com siRNA-*C8orf48*, estas células apresentaram uma redução da expressão do gene *C8orf48* de aproximadamente 50% (Figura III-16).

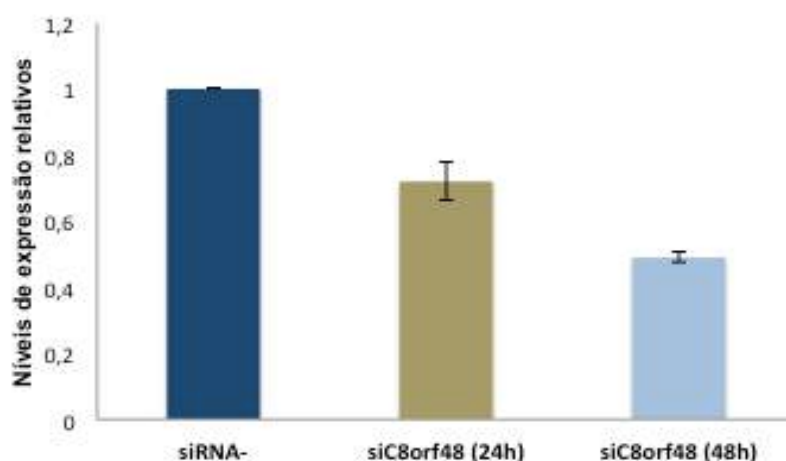


Figura III-16 - Níveis de expressão relativos do gene *C8orf48* nas células TPC-1 24h e 48 h após transfecção com o siRNA-*C8orf48* e siRNA-. Os níveis de expressão destes genes foram determinados por qRT-PCR e normalizados em relação aos níveis de expressão do gene *GAPDH*. Os níveis de expressão do gene *C8orf48* foram analisados em relação ao gene *C8orf48* em células transfectadas com o siRNA- (controlo negativo). Os valores apresentados correspondem à média de triplicados.

1.3.2 Estudo da proliferação celular por citometria de fluxo

Para avaliar o efeito do silenciamento do gene *C8orf48* na proliferação celular, 24h e 48h após a transfecção transitória do siRNA-*C8orf48* na linha celular tumoral TPC-1, analisou-se o ciclo celular nestas células por citometria de fluxo (secção 13 dos Materiais e Métodos). As células TPC-1 foram também transfectadas com siRNA-. A Figura II-5 (secção 13 Materiais e Métodos) apresenta um exemplo de um histograma correspondente à transfecção do siRNA- em células TPC-1).

A percentagem de células TPC-1 nas diferentes fases do ciclo celular foi muito semelhante, quando comparando as células transfectadas com o siRNA-*C8orf48* com as transfectadas com o

controlo negativo (siRNA-), em cada *time point* (Figura III-17). Contudo, 48h após a transfecção, quer com siRNA-C8orf48 ou com siRNA-, as células TPC-1 apresentavam uma maior percentagem de células na fase G1/G0 (aproximadamente 90%), quando comparadas com as mesmas células 24h após a transfecção (aproximadamente 65%). Esta elevada percentagem de células na fase G1/G0 48 horas após a transfecção pode-se dever à elevada confluência celular nas placas (cerca de 100%), que pode restringir a replicação celular.

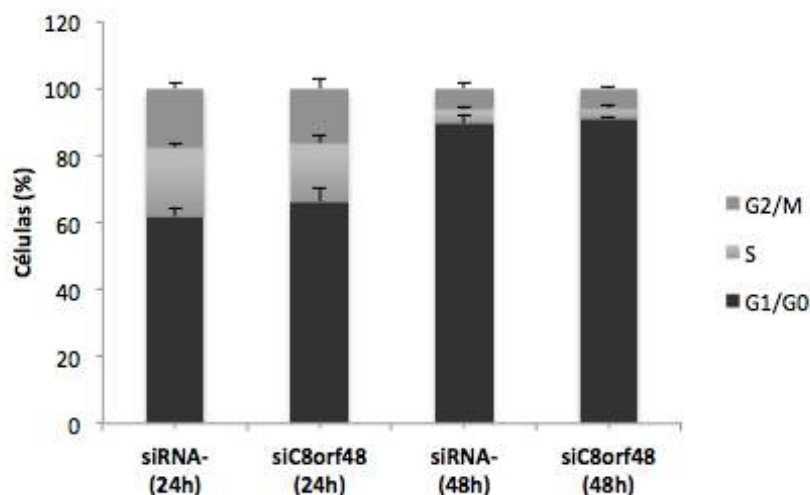


Figura III-17 – Efeito do silenciamento do gene *C8orf48* no ciclo celular, em células TPC-1. Vinte e quatro e quarenta e oito horas após transfecção transiente da linha celular tumoral TPC-1 com siRNA-C8orf48, analisou-se o ciclo celular nestas células por citometria de fluxo. As células TPC-1 transfectadas com siRNA- foram utilizadas como controlo negativo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de uma experiência com triplicados.

Estes resultados sugerem que o gene *C8orf48* não está envolvido nos mecanismos da síntese de DNA e replicação celular, neste modelo celular. No entanto, o número de ensaios realizados foi insuficiente para realizar uma análise estatística, pelo que será necessário realizar novos ensaios nas mesmas condições.

1.3.3 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo

Para avaliar o efeito do silenciamento do gene *C8orf48* na morte celular, 48h após a transfecção transitória do siRNA-C8orf48 na linha celular tumoral TPC-1, e indução da morte celular com radiação UV, analisou-se a necrose e apoptose celular (precoce e tardia) por citometria de fluxo (secção 14 dos Materiais e Métodos). As células TPC-1 foram também transfectadas com siRNA- (controlo negativo).

A percentagem de células TPC-1 transfectadas com o siRNA- necróticas aumentou de 2% (células não irradiadas) para aproximadamente 40%, após irradiação com UV, independentemente do tempo de irradiação. A percentagem de células transfectadas com o mesmo controlo negativo que se encontravam em apoptose tardia, diminuiu após irradiação com UV, sendo esta diminuição mais acentuada quando a irradiação foi mais longa. (Figura III-18).

Quando as células TPC-1 foram transfectadas com o siRNA-C8orf48, a percentagem de células necróticas aumentou após irradiação com UV, sendo este aumento mais acentuado quando a irradiação foi mais longa. Este aumento foi no entanto muito menos acentuado, quando comparado com o que foi observado nas células transfectadas com siRNA-. A percentagem de células transfectadas com o siRNA-C8orf48 que se encontravam em apoptose tardia, aumentou de 6% (células não irradiadas) para 12% após irradiação com UV, independentemente do tempo de irradiação, contrastando com a redução na apoptose tardia observada nas células transfectadas com siRNA- (Figura III-18).

Tanto para as células transfectadas com o siRNA-C8orf48, como com o controlo negativo siRNA, observou-se uma ligeira diminuição da percentagem de células em apoptose precoce quando as células foram irradiadas (Figura III-18).

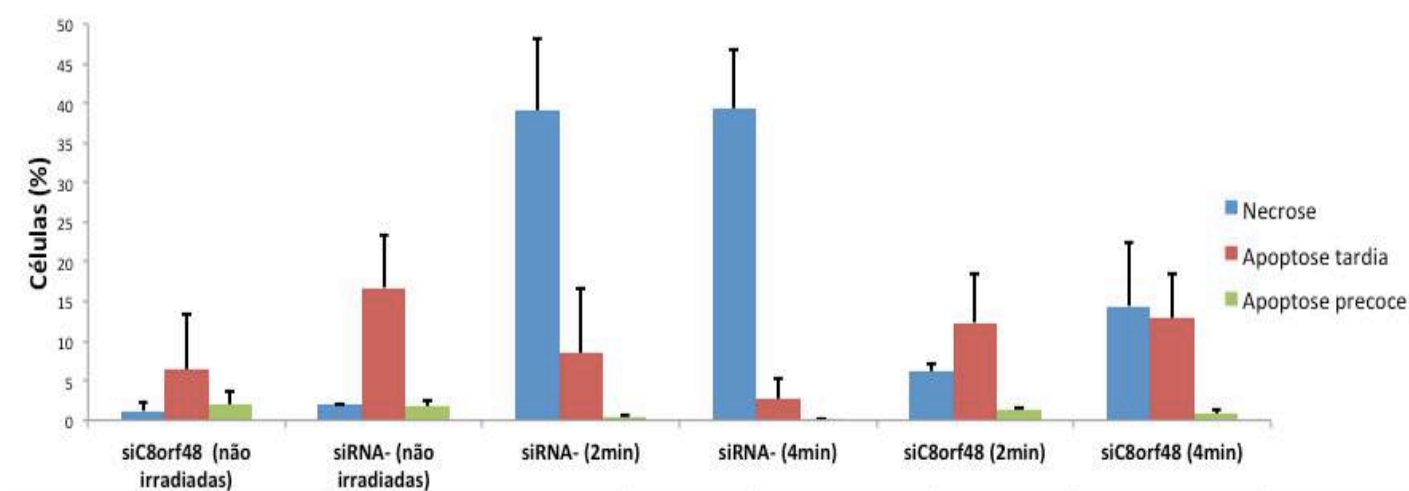


Figura III-18 – Efeito do silenciamento do gene *C8orf48* na morte celular. 48 horas após transfeção transiente da linha celular tumoral TPC-1 com siRNA-C8orf48 e indução da morte celular com radiação UV (2 min e 4 min), analisou-se a apoptose e necrose celular por citometria de fluxo. As células TPC-1 transfectadas com siRNA- foram utilizadas como controlo negativo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de duas experiências com triplicados.

Estes resultados preliminares sugerem que o silenciamento da expressão do gene *C8orf48* induz a apoptose (tardia) nas células TPC-1, e que este mecanismo não é activado quando o gene está a ser expresso, ocorrendo nestas condições a necrose celular. Será, no entanto, necessário realizar mais ensaios, nas mesmas condições, para avaliar se esta diferença é estatisticamente significativa. Será também importante testar o efeito de um outro siRNA- (com uma sequência distinta) e de um plasmídeo controlo (transfecção sem siRNA).

1.4 Estudo do efeito da reposição da expressão do gene *C8orf48* após o seu silenciamento

1.4.1 Ensaio de ciclo celular

Para estudar o efeito da reposição da expressão do gene *C8orf48*, previamente silenciado (com siRNA-*C8orf48*) na linha celular TPC-1, 24 horas após a transfecção transitória com o siRNA-*C8orf48*, transfectaram-se transitoriamente estas células com os vectores PCDNA3, WT e MUT (condições de transfecção descritas na secção 3.2.1 dos Materiais e Métodos). Vinte e quatro horas após transfecção dos plasmídeos PCDNA3, WT e MUT analisou-se as diferentes fases do ciclo celular por citometria de fluxo (secção 13 dos Materiais e Métodos). As células TPC-1 que foram sujeitas a uma primeira transfecção com o siRNA- foram novamente transfectadas com o controlo negativo na segunda transfecção.

A percentagem de células TPC-1 nas diferentes fases do ciclo celular foi muito semelhante, independentemente do vector que foi expresso (PCDNA3, WT e MUT), tendo sido detectadas cerca de 85% de células na fase G1/G0, 5-10% na fase S e 5-10% de células na fase G2/M (Figura III-19). As células TPC-1 transfectadas apenas com o controlo negativo (siRNA-) apresentaram uma distribuição idêntica.

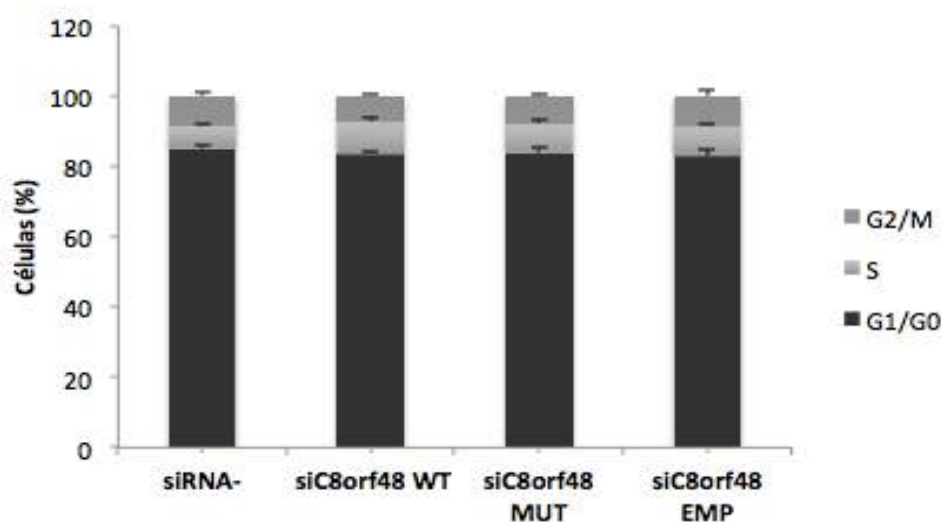


Figura III-19 - Efeito no ciclo celular da reposição da expressão do gene *C8orf48*. 24 horas após transfecção transiente da linha celular tumoral TPC-1 (previamente transfectada com siRNA-*C8orf48*) com os plasmídeos WT, MUT e PCDNA3, analisou-se o ciclo celular nestas células por citometria de fluxo. As células TPC-1 transfectadas com siRNA- foram utilizadas como controlo negativo. Os dados representam a média \pm desvio padrão de uma experiência.

Estes resultados, que sugerem que a reposição da expressão do gene *C8orf48* não afecta os mecanismos da síntese de DNA e replicação celular, neste modelo celular, o que seriam de alguma forma esperados, uma vez que não se tinha anteriormente observado efeito do silenciamento do gene no ciclo celular. No entanto, o número de ensaios realizados foi insuficiente para realizar uma análise estatística, pelo que será necessário realizar novos ensaios nas mesmas condições.

IV DISCUSSÃO

O cancro da tiróide corresponde a cerca de 1% de todas as ocorrências mundiais de cancro, sendo a neoplasia mais comum do sistema endócrino (DeLellis *et al.*, 2004). Os carcinomas não medulares da tiróide (NMTC), que são derivados das células foliculares da tiróide, representam aproximadamente 90% dos tumores da tiróide (DeLellis *et al.*, 2006), sendo que 5-10% dos casos resultam de uma predisposição familiar, sendo designados por formas familiares de NMTC (FNMTC) (Malchoff e Malchoff, 2006; Bonora *et al.*, 2010).

Estudos de mapeamento genético, através da análise de *linkage* em famílias, possibilitaram a identificação de 8 regiões cromossómicas onde se localizam genes de susceptibilidade para o FNMTC [1q21 (145,20-146,25 Mb), 1q21 (142,6-155 Mb), 2q21, 6q22, 8p23.1-p22, 8q24, 14q31, 19p13.2] (Bignell *et al.*, 1997; Canzian *et al.*, 1998; Malchoff *et al.*, 2000; McKay *et al.*, 2001; Cavaco *et al.*, 2008; Gudmundsson *et al.*, 2009; Suh *et al.*, 2009).

No entanto, até à data, foram apenas identificados os genes de susceptibilidade: *DICER1* (*locus* 14q31), *SRGAP1*, *NKX2-1*, *FOXE1* e *HABP2* (Ngan *et al.*, 2009; Frio *et al.*, 2011; He *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2015; Gara *et al.*, 2015). O envolvimento de diferentes *loci* de susceptibilidade sugere a existência de heterogeneidade genética para o FNMTC (Cavaco *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2015).

A identificação de genes de susceptibilidade para o FNMTC tem sido realizada maioritariamente através do mapeamento genético, utilizando a análise de *linkage*, ou então a partir da pesquisa directa de mutações germinais em genes candidatos, que são seleccionados com base na sua função. Mais recentemente, tem sido utilizada a tecnologia de sequenciação de nova geração (NGS) para a sequenciação global do exoma (WES), assim como a combinação desta tecnologia com a análise de *linkage*, com o objectivo de identificar genes mutados, que se localize nas regiões de susceptibilidade mapeadas (Gazal *et al.*, 2015).

- **Estudo funcional da variante p.T22I do gene *C8orf48* identificada numa família com FNMTC**

Como já foi referido anteriormente, o nosso grupo mapeou um novo *locus* de susceptibilidade para o FNMTC, na região cromossómica 8p23.1-p22, que foi designado por *FTEN* (*Familial Thyroid Epithelial Neoplasia*) (Cavaco *et al.*, 2008). Posteriormente, num estudo desenvolvido também pelo nosso grupo, identificou-se uma nova variante (c.65C>T, p.T22I) no gene *C8orf48* num doente da família 1, a partir da sequenciação global do exoma (Pereira, 2012). Estudos de segregação demonstraram que para além do probando, quinze familiares também apresentavam a mesma variante no gene *C8orf48*, que não se encontrava presente em 50 controlos normais, não sendo assim um polimorfismo comum na população Portuguesa (Pereira, 2012). Relativamente à proteína codificada pelo gene *C8orf48*, até ao momento só foi descrito na literatura de uma interacção entre esta proteína e a proteína MDFI (Venkatesan *et al.*, 2009), que está envolvida na via metabólica Wnt. Para clarificar qual o papel/interacção da proteína codificada pelo gene *C8orf48* com a via Wnt, foi realizada pelo nosso grupo uma análise do perfil global de expressão num tumor do probando,

utilizando micro-arrays de oligonucleótidos, o que revelou que os genes *CLDN1*, *CD44*, *CCND1* e *MYC* se encontravam sobre-expressos, comparativamente com tecido normal. Contudo, este tumor também apresentava uma mutação somática no gene *BRAF*, o que poderá ter igualmente contribuído para o aumento de expressão desses genes-alvo. De seguida, foi realizado um estudo de haplotipos nesta família, para definir a sequência do gene *C8orf48* nos indivíduos afectados, que foi subsequentemente utilizada na construção dos vectores (através de subclonagem e mutagénese dirigida) para os estudos funcionais (Santos, 2013).

No presente projecto de Mestrado, tendo em conta a informação atrás mencionada e as evidências experimentais anteriores, pretendeu-se desenvolver novos estudos funcionais do gene *C8orf48*, para estudar a função deste gene e para caracterizar a possível patogenicidade da variante que foi detectada no mesmo.

1 Estudo dos níveis de expressão da proteína C8orf48 resultante de transfecções transitórias e estáveis de linhas celulares tumorais (HeLa, NIH 3T3 e TPC-1) e de células foliculares de tiróide normal (PCCL3)

Inicialmente realizaram-se ensaios de Western blot a partir de células HeLa transfectadas transitoriamente e de forma estável com os plasmídeos pcDNA3NeoMyc (PCDNA3), pcDNA3NeoMyc-C8ORF48WT (WT) e pcDNA3NeoMyc-C8ORF48MUT (MUT), detectando-se expressão da proteína exógena Myc-C8orf48 (38 kDa) proveniente da transfecção transitória dos plasmídeos WT e MUT. O nível de expressão resultante da expressão dos dois vectores era idêntica, sugerindo que a variante p.T22I não alterava o nível de expressão da proteína codificada pelo gene *C8orf48*. No entanto, nas *pools* de células HeLa WT e MUT, não se visualizou a banda correspondente ao tamanho da proteína em estudo, tendo no entanto sido detectadas as bandas correspondentes aos controlos positivos Myc-Rac1 e Myc-Rac1b. Estes resultados sugeriram que a técnica de Western blot poderia não ter sensibilidade suficiente para detectar os baixos níveis de expressão da proteína Myc-C8orf48.

A diferença entre os níveis de expressão observados para proteína exógena Myc-C8orf48 nas transfecções transitórias e *pools* de células HeLa, poderá estar relacionada com a utilização de geneticina para se estabelecer as *pools*, uma vez que diferentes níveis de resistência ao antibiótico, de diferentes subpopulações celulares da *pool*, poderão levar a níveis de expressão distintos do gene de interesse, sendo esta uma possível explicação para a baixa/ausência de expressão observada nas *pools* de células HeLa.

Uma vez que o objectivo deste projecto de Mestrado foi estudar o efeito da variante p.T22I no gene *C8orf48* em células tumorais e normais da tiróide, depois de confirmar no modelo celular HeLa, que a construção do plasmídeo tinha sido realizada de forma adequada para a expressão da referida proteína de interesse (formas WT e MUT), estudou-se a expressão das proteínas C8orf48 WT e MUT, após transfecções transitórias em células foliculares da tiróide normais de *Rattus norvegicus* (PCCL3). Neste modelo celular, a expressão transitória da proteína exógena Myc-C8orf48 WT ou MUT foi muito reduzida, independentemente das condições utilizadas. Quando foram analisadas *pools* de células de carcinoma papilar da tiróide humana (TPC-1), não foi detectada expressão da

proteína exógena Myc-C8orf48 WT ou MUT, possivelmente pelas mesmas razões acima descritas para as células HeLa.

Desta forma, optou-se por estudar a expressão da proteína Myc-C8orf48 WT e MUT a partir de transfeções transitórias e estáveis de células embrionárias de fibroblastos de murganho (NIH 3T3), uma vez que são células para as quais se consegue habitualmente uma elevada eficiência de transfecção e nas quais é possível induzir uma transformação para fenótipo tumoral pela expressão de oncogenes, características importantes para o estudo de genes cujo efeito na tumorigénese é ainda desconhecido (Copeland *et al.*, 1979). No entanto, os resultados foram idênticos aos anteriores, não tendo sido detectada expressão transitória ou estável da proteína Myc-C8orf48 (WT e MUT). Desta forma, apesar de não se ter observado expressão da proteína Myc-C8orf48 nas *pools* das células NIH 3T3, o facto de ter sido detectada expressão dos transcritos MUT e WT por RT-PCR (não-quantitativo), levou a que se optasse por avançar para os estudos funcionais da variante p.T22I (c.65C>T) do gene *C8orf48* neste modelo celular.

2 Estudo do papel da variante p.T22I do gene *C8orf48* na proliferação e migração em *pools* de NIH 3T3

Apesar de não ter sido detectada expressão transitória ou estável da proteína Myc-C8orf48 (WT e MUT), foi no entanto detectada expressão dos transcritos MUT e WT por RT-PCR (não-quantitativo). A expressão relativa destes transcritos nas *pools* de células NIH 3T3, foi posteriormente quantificada por qRT-PCR, observando-se que a *pool* MUT apresentava uma expressão do gene *C8orf48* (exógeno) 1,8 vezes superior à da *pool* WT. A *pool* PCDNA3 apresentou uma expressão muito baixa, quando comparada com a *pool* WT, resultados esperados uma vez que o plasmídeo PCDNA3 integrado nessa *pool* não tinha a sequência do gene *C8orf48*.

A discrepância observada entre os resultados obtidos por qRT-PCR, e os que foram obtidos por Western blot, para as *pools* das células NIH 3T3, sugere que os mecanismos de tradução da célula (Crick FH, 1958) poderão ter sofrido alterações funcionais. Outra possibilidade para explicar a ausência de expressão da proteína de interesse é a possível excisão da região onde se encontra o gene *C8orf48* (WT ou MUT) quando o vector foi integrado no genoma de algumas células que deram origem às referidas *pools*, permanecendo apenas integrada a região do plasmídeo que confere resistência ao antibiótico. No entanto, outras células que também deram origem a estas *pools* poderão ter mantido o gene *C8orf48*. A existência nas *pools* de células com e sem o gene, acrescida pelo efeito do antibiótico (já explicado anteriormente) poderá justificar a baixa expressão do mesmo, apenas detectável por RT-PCR, técnica mais sensível do que o Western blot.

Apesar da ausência de expressão da proteína Myc-C8orf48 nas *pools*, optou-se por avançar nos estudos funcionais da variante p.T22I (c.65C>T) do gene *C8orf48*, para estudar o seu efeito.

A proliferação celular foi avaliada por contagem directa em hemocítmetro, tendo-se observado que a *pool* NIH 3T3 MUT apresentava uma proliferação celular muito próxima das restantes *pools* (PCDNA3 e WT) para todos os *time-points* estudados (0h, 48h, 72h, 96h e 120h), não havendo resultados com diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$). Estes resultados sugerem que a variante p.T22I do gene *C8orf48* não confere uma vantagem proliferativa, no modelo celular NIH 3T3.

A migração celular também foi avaliada nas *pools* de NIH 3T3 (PCDNA3, WT e MUT). A *pool* MUT apresentou uma reparação da área lesada da monocamada de células idêntica às *pools* PCDNA3 e WT, independentemente dos *time-points* analisados (4h, 8h, 12h), não havendo diferenças significativas entre cada uma das *pools* ($P>0,05$). Desta forma, os resultados obtidos sugerem que a variante p.T22I no gene *C8orf48* não tem efeito na migração, neste modelo celular.

A baixa/ausente expressão da proteína C8orf48 (WT e MUT) nas *pools*, apesar da expressão detectada dos respectivos transcritos, poderá justificar os resultados obtidos nos estudos de proliferação e migração celular. A homologia de cerca de 60% entre o gene *C8orf48* humano (WT e MUT) e o gene *C8orf48* de murganho (NCBI Blast - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), poderá também ter contribuído para que não se observassem diferenças nos efeitos das formas WT e MUT do gene *C8orf48*, neste modelo celular. Desta forma, apesar da dificuldade de detecção da expressão da proteína de interesse nos modelos celulares PCCL3 e TPC-1, seria interessante realizar estudos funcionais incluindo estes dois modelos celulares, para investigar se a percentagem de homologia entre os genes de ratinho, ratazana e humano poderá influenciar o efeito da variante p.T22I do gene *C8orf48*.

O gene *C8orf48* com a variante c.65C>T poderá apenas levar à iniciação tumoral, desencadeando mecanismos que conduzem à progressão tumoral, através da aquisição de mutações somáticas em oncogenes, como por exemplo, *RAS* ou *BRAF*, explicando desta forma a ausência de diferenças significativas na migração e proliferação celular observada para as *pools* WT e MUT.

A expressão da β -catenina nas três *pools* de NIH 3T3 (PCDNA3, WT e MUT), foi analisada por Western blot. Observou-se que a expressão da β -catenina de murganho era 1,8 e 1,6 vezes maior nas *pools* WT e MUT, respectivamente, relativamente à *pool* PCDNA3, sugerindo que a expressão exógena do C8orf48 (MUT ou WT) poderá afectar a expressão desta proteína. Contudo, será necessário repetir esta análise nas mesmas condições a partir de *pools* obtidas em diferentes passagens celulares. Se estes resultados forem confirmados, será interessante analisar os níveis de expressão da β -catenina após silenciamento e reposição da expressão do gene *C8orf48*.

3 Estudo do papel do gene *C8orf48* na viabilidade e morte celular em células TPC-1

A citometria de fluxo permite determinar a proporção de células em diferentes fases do ciclo celular, o que se relaciona com a proliferação celular (Rabinovitch, 1994).

Uma outra estratégia utilizada neste projecto, para esclarecer qual o papel do gene *C8orf48* na tumorigénese, consistiu no seu silenciamento numa linha tumoral de tiróide (TPC-1), através da transfecção com siRNA específico para este gene. Quarenta e oito horas após a transfecção com siRNA-C8orf48, estas células apresentavam uma redução da expressão do gene *C8orf48* de aproximadamente 50% (comparando com o controlo negativo). No entanto, os resultados obtidos no estudo da proliferação celular por citometria de fluxo sugeriram que o gene *C8orf48* não está envolvido neste processo celular.

Para estudar o efeito da reposição da expressão do gene *C8orf48*, com e sem variante p.T22I, na proliferação celular, silenciou-se a sua expressão com a transfeção de siRNA e posteriormente, realizou-se uma transfeção transitória, nas mesmas células, com os vectores PCDNA3, WT e MUT. Os resultados obtidos por citometria de fluxo sugeriram que a reposição da expressão do gene *C8orf48*, na forma WT ou MUT, não afectou a proliferação, neste modelo celular, de acordo com os resultados obtidos anteriormente após o silenciamento do gene.

Para além do aumento das capacidades proliferativa e migratória, as células tumorais adquirem também uma resistência intrínseca à morte celular, limitando ou evitando a apoptose (Hanahan e Weinberg, 2011).

Neste projecto, resultados preliminares de estudo do efeito do gene *C8orf48* na apoptose, sugerem que o seu silenciamento induz a apoptose (tardia) nas células TPC-1, e que este processo é menos significativo quando o gene está a ser expresso, ocorrendo nestas condições a necrose celular.

Em estudos futuros, será importante prosseguir o estudo do papel do gene *C8orf48* (WT e MUT) na apoptose celular, identificando os potenciais efectores celulares pró- e/ou anti-apoptóticos envolvidos neste processo.

V CONCLUSÃO

No presente trabalho, procedeu-se ao estudo funcional do gene *C8orf48*, e de uma variante deste gene identificada numa família com FNMTc, através de estudos *in vitro*.

A detecção da expressão transitória ou estável da proteína Myc-C8orf48 (WT e MUT), nos diferentes modelos celulares utilizados, foi em geral baixa/nula. Poderão ter contribuído para estes resultados a utilização de geneticina no estabelecimento das *pools*, a baixa eficiência de integração do gene de interesse no genoma destas células e a sensibilidade da técnica de Western blot para a detecção de proteínas com um nível de expressão baixo.

Foi no entanto detectada expressão dos transcritos MUT e WT por RT-PCR (não-quantitativo) em *pools* de células NIH 3T3, que foram seleccionadas como modelo celular para os estudos funcionais.

Os resultados dos estudos *in vitro* com células embrionárias de fibroblastos de murganho, sugerem que a variante p.T22I no gene *C8orf48* poderá não estar envolvida na migração e proliferação celular. No entanto, esta ausência de efeito poderá também estar relacionada com as condicionantes experimentais, acima referidas, ou ainda com a utilização de um modelo celular (murganho) em que o gene de interesse endógeno apresenta uma homologia de 60% com o gene humano (de expressão exógena). Desta forma, seria interessante realizar os mesmos estudos funcionais de proliferação e migração celular em células PCCL3 e TPC-1 para clarificar qual a relevância da homologia, bem como analisar o efeito da variante em estudo na morte celular.

Os resultados do estudo da expressão da β -catenina nas *pools* WT e MUT sugerem que a expressão exógena da *C8orf48* poderá afectar a expressão dessa proteína, pelo que seria

interessante, em trabalhos futuros, analisar os níveis de expressão da β -catenina após silenciamento do gene *C8orf48* endógeno.

Em estudos preliminares, realizados com células TPC-1, nos quais foi silenciado o gene *C8orf48*, observou-se a indução de apoptose tardia, após exposição das células a radiação UV, contrastando com a necrose observada quando o gene não é silenciado. Futuramente, será importante prosseguir o estudo do papel do gene *C8orf48* (WT e MUT) na morte celular, identificando os potenciais efectores celulares pró- e/ou anti-apoptóticos envolvidos neste processo.

A clarificação do papel do gene *C8orf48* na etiologia do FNMTc é fundamental, porque poderá representar um novo gene de susceptibilidade para esta doença, o que, se se confirmar, contribuirá para a compreensão dos mecanismos moleculares que originam o cancro nestas famílias, assim como permitirá a identificação precoce dos portadores de mutação, podendo ainda contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

VI BIBLIOGRAFIA

- Baba AI, Câtoi C (2007) *Comparative Oncology*. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy
- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* **116**: 281
- Bignell GR, Canzian F, Shayeghi M, Stark M, Shugart YY, Biggs P, Mangion J, Hamoudi R, Rosenblatt J, Buu P, Sun S, Stoffer SS, Goldgar DE, Romeo G, Houlston RS, Narod SA, Stratton MR, Foulkes WD (1997) Familial Nontoxic Multinodular Thyroid Goiter Locus Maps to Chromosome 14q but Does Not Account for Familial Nonmedullary Thyroid Cancer. *Am J Hum Genet* **61**: 1123-1130
- Bonora E, Tallini G, Romeo G (2010) Genetic Predisposition to Familial Nonmedullary Thyroid Cancer: An Update of Molecular Findings and State-of-the-Art Studies. *J Oncol* **2010**: 1-7
- Brockman W, Alvarez P, Young S, Garber M, Giannoukos G, Lee WL, Russ C, Lander ES, Nusbaum C, Jaffe DB (2008) Quality scores and SNP detection in sequencing-by-synthesis systems. *Genome Research* **18**: 763-770
- Cantara S, Pisu M, Frau DV, Caria P, Dettori T, Capezzone M, Capuano S, Vanni R, Pacini F (2012) Telomere abnormalities and chromosome fragility in patients affected by familial papillary thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **97**: E1327-1331
- Canzian F, Amati P, Harach HR, Kraimps JL, Lesueur F, Barbier J, Levillain P, Romeo G, Bonneau D (1998) A gene predisposing to familial thyroid tumors with cell oxyphilia maps to chromosome 19p13.2. *Am J Hum Genet* **63**: 1743-1748
- Capezzone M, Cantara S, Marchisotta S, Filetti S, De Santi MM, Rossi B, Ronga G, Durante C, Pacini F (2008) Short telomeres, telomerase reverse transcriptase gene amplification, and increased telomerase activity in the blood of familial papillary thyroid cancer patients. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 3950-3957
- Capezzone M, Marchisotta S, Cantara S, Pacini F (2009) Telomeres and thyroid cancer. *Curr Genomics* **10**: 526-533
- Caron NR (2006) Papillary thyroid cancer. *Currents Treatment Options in Oncology* **7**: 309-319
- Castro P, Rebocho AP, Soares RJ, Magalhães J, Roque L, Trovisco V, Vieira de Castro I, Cardoso-de-Oliveira M, Fonseca E, Soares P, Sobrinho-Simões M (2006) *PAX8-PPAR γ rearrangement is frequently detected in the follicular variant of papillary thyroid carcinoma*. *J Clin Endocrinol Metab* **91**: 213-220
- Cavaco BM, Batista PF, Martins C, Banito A, Rosário F, Limbert E, Sobrinho LG, Leite V (2008) Familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc): analysis of fPTC/PRN, NMTC1, MNG1 and TCO susceptibility loci and identification of somatic BRAF and RAS mutations. *End Rel Cancer* **15**: 207-215
- Cavaco BM, Batista PF, Sobrinho LG, Leite V (2008b) Mapping a New Familial Thyroid Epithelial Neoplasia Susceptibility Locus to Chromosome 8p23.1-p22 by High Density Single-Nucleotide Polymorphism Genome-Wide Linkage Analysis. *J Clin Endocrinol Metab* **93**: 4426- 4430
- Cecchini, MJ *et al.* (2012) Analysis of cell cycle position in mammalian cells. *J. Vis. Exp.* **7**: 1–7
- Chen C, Okayama H (1987) High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Molecular and celular biology* **7**: 2745-2752

- Chial H (2008) Tumor Suppressor (TS) Genes and the Two-Hit Hypothesis. *Nature Education* **1**:177
- Choi M, Scholl UI, Ji W, Liu T, Tikhonova IR, Zumbo P, Nayir A, Bakkaloglu A, Özen S, Sanjad S, Nelson-Williams C, Farhi A, Mane S (2009) Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 19096-19101
- Chung HR (2014) Iodine and thyroid function. *Ann Pediatr Endocrinol Metab* **19**: 8-12
- Copeland NG, Cooper GM (1979) Transfection by exogenous and endogenous murine retrovirus DNAs. *Cell* **16**: 347-356
- Crick FH (1958) On protein synthesis *Symp Soc Exp Biol* **12**: 138-163
- Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K (2003) Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene* **22**: 8330 – 8336
- Curado MP, Edwards B, Shin HR *et al.* (2007) Cancer incidence in Five Continents. *IARC Scientific Publications* vol. 9, No .160, Lyon, France: IARC
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ, Ciccarone VC (2004) Advanced transfection with lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA and high-throughput applications. *Methods* **33**: 95-103
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (2004) World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Endocrine Organs. Lyon, França: IARC Press
- DeLellis RA (2006) Pathology and genetics of thyroid carcinoma. *J Surg Oncol* **94**: 662-669
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Whillie AH (1992) Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1133**: 275– 85.
- Dunn GP, Koebel CM and Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Tumour Immunology* **6**: 836-848
- Eberhardt NL, Grebe SKG, McIver B, Reddi HV (2010) The role of *PAX8/PPAR γ* fusion oncogenes in the pathogenesis of follicular thyroid cancer. *Mol Cell Endocrinol* **321**:50-56
- Elrich SR (2007) Frontiers in cell apoptosis research, Nova Science Publishers
- Erickson LA (2014) Atlas of Endocrine pathology. New York, USA: Springer Science
- Espadinha C, Cavaco BM, Leite V (2007) PAX8PPAR γ stimulates cell viability and modulates expression of thyroid-specific genes in a human thyroid cell line. *Thyroid* **17**: 497-509
- Fancy T, Gallagher D3rd, Hornig JD (2010) Surgical Anatomy of the thyroid and parathyroid glands. *Otolaryngol Clin North Am* **43**: 221-227,vii.
- Figge JJ (2006) Epidemiology of Thyroid Cancer. *Thyroid Cancer, A comprehensive guide to clinical management*: 9-13
- Fusco A, Berlingieri MT, Di Fiore PP, Portela G, Grieco M and Vecchio G (1987) One- and two-step transformations of rat thyroid epithelial cells by retroviral oncogenes. *Molecular and Cellular Biology*, **7**: 3365-337
- Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, Rahman N, Stratton MR (2004) A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **3**: 177-183

- Frio TR, Bahubeshi A, Kanellopoulou C, Hamel N, Niedziela M, Sabbaghian N, Pouchet C, Gilbert L, O'Brien PK, Serfas K, Broderick P, Houlston RS, Bonora E, Muljo S, Schimke RN, Soglio D B, Arseneau J, Schultz KA, Priest JR, Nguyen V, Harach HR, Livingston DM, Foulkes WD, Tischkowitz (2011) *DICER1* mutations in Familial Multi-Nodular Goiter with and without Ovarian Sertoli-Leydig Cell Tumors. *JAMA* **305**: 68-77.
- Gara SK, Jia L, Merino MJ, Agarwal SK, Zhang L, Cam M, Patel D, Kebebew E (2015) Germline *HABP2* mutation causing familial nonmedullary thyroid cancer. *N Eng J Med* **373**: 448-455
- Gazal S, Gosset S, Verdura E, Bergametti F, Guey S, Babron MC, Tournnier-Lasserve E (2015) Can whole-exome sequencing data be used for linkage analysis? *Eur J Hum Genet* [Epub ahead of print]
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.* **12**: 264-265
- Gilson E, Londono-Vallejo A (2007) Telomere length profile in humans. *Cell Cycle* **6**: 2486-2494
- Gomberg-Maitland M, Frishman WH (1998) Thyroid hormone and cardiovascular disease. *Am Heart J* **135**: 187-196
- Gudmundsson J, Sulem P, Gudbjartsson DF, Jonasson JG, Sigurdsson A, Bergthorsson JT, He H, Blondal T, Geller F, Jakobsdottir M, Magnusdottir DN, Matthiasdottir S, Stacey SN, Skarphedinsson OB, Helgadottir H, Li W, Nagy R, Aguillo E, Faure E, Prats E, Saez B, Martinez M, Eyjolfsson GI, Bjornsdottir US, Holm H, Kristjansson K, Frigge ML, Kristvinsson H, Gulcher JR, Jonsson T, Rafnar T, Hjartarsson H, Mayordomo JI, de la Chapelle A, Hrafnkelsson J, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2009) Common variants on 9q22.33 and 14q13.3 predispose to thyroid cancer in European populations, *Nat. Genet.* **41**: 460
- Gutmann DH (2001) The neurofibromatoses: when less is more. *Human Molecular Genetics* **7**: 747-755
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* **100**: 57-70
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
- He H, Nagy R, Liyanarachchi S, Jiao H, Li W, Suster S, Kere J, de la Chapelle A (2009) A Susceptibility Locus for Papillary Thyroid Carcinoma on Chromosome 8q24. *Cancer Res* **69**: 625-631
- He H, Bronisz A, Liyanarachchi S, Nagy R, Li W, Huang Y, Akagi K, Saji M, Kula D, Wojcicka A, Sebastian N, Wen B, Puch Z, Kalemba M, Stachlewska E, Czetwertynska M, Dlugosinska J, Dymecka K, Ploski R, Krawczyk M, Morrison PJ, Ringel MD, Kloos RT, Jazdzewski DE, Vieland VJ, Ostrowski M, Jarzab B, de la Capelle A (2013) SRGAPq is a candidate gene for papillary thyroid carcinoma susceptibility. *J Clin Endocrinol Metab* **98**: E973-980
- Hoyes AD, Kershaw DR (1985) Anatomy and development of the thyroid gland. *Ear Nose Throat J* **64**:318-333
- Howell GM, Hodak SP, Yip L (2013) RAS mutations in thyroid cancer. *Oncologist* **18**: 926-932
- Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990) PCR protocols: a guide to methods and applications. *Academic Press*, New York
- Ishizaka Y, Itoh F, Tahira T, Ikeda I, Ogura T, Sugimura T, Nagao M (1989) Presence of aberrant transcripts of ret protooncogene in a human papillary thyroid carcinoma cell line. *Jpn J Cancer Res* **80**: 1149-1152
- Ito Y, Nikiforov YE, Schlumberger M, Vigneri R (2013) Increasing Incidence of thyroid cancer: controversies explored. *Nat Rev Endocrinol* **9**: 178-184

- Jeong SH, Hong HS, Kwakk JJ, Lee EH (2015) Analysis of RAS mutation and PAX8/PPAR γ rearrangements in follicular-derived thyroid neoplasms in a Korean population: frequency and ultrasound findings. *J Endocrinol Invest* **38**: 849-857
- John M (2002) HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nature Reviews Cancer* **2**: 315-319
- Ju Z, Rudolph L (2008) Telomere dysfunction and stem cell ageing. *Biochimie* **90**: 24
- Kebebew E (2008) Hereditary non-medullary thyroid cancer. *World Journal of Surgery* **32**: 678-682
- Kim R, Emi M and Tanabe K (2007) Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* **121**: 1-14
- Kim TK, Eberwime JH (2010) Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal Bioanal Chem* **397**: 3173-3178
- Knudson AG (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci* **68**: 820-823
- Komiya Y, Habas R (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**: 68-75
- Kondo T, Ezzat S, Asa SL (2006) Pathogenetic mechanisms in thyroid follicular-cell neoplasia. *Nat Rev Cancer* **6**: 292-306
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acid Res* **39**: 152
- Krassas GE, Poppe K, Glinioer D (2010) Thyroid function and human reproductive health. *Endocrine Reviews* **5**: 702-755
- Landry JJM, Pyl PT, Rausch T, Zichner T, Tekkedil MM, Stutz AM, Jauch A, Aiyar RS, Pau G, Delhomme N, Gagneur J, Korbel JO, Huber W, Steinmetz LM (2013) The genomic and transcriptomic landscape of HeLa cell line. *G3* **8**: 1213-1224
- Lee JG, Kay EP (2006) FGF-2 induced wound healing in corneal endothelial requires Cdc42 activation and Rho inactivation through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **47**: 1376-1386
- Littlefield JW (1982) NIH 3T3 cell line. *Science* **218**: 214-216
- LiVolsi VA, Baloch ZW (2009) Familial thyroid carcinoma: the road less travelled in thyroid pathology. *Diagnostic Histopathology* **15**: 2
- Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky L, Darnell J (2004) *Molecular Cell Biology*, 5th edn. NY, EUA: W. H. Freeman
- Maftah A, Huet O, Gallet PF, Ratinaud MH (1993) . Flow cytometry's contribution to the measurement of cell functions. *Biol. Cell* **78**: 85-93.
- Malchoff CD, Sarfarazi M, Tendler B, Forouhar F, Whalen G, Joshi V, Arnold A, Malchoff DM (2000) Papillary Thyroid Carcinoma Associated with Papillary Renal Neoplasia: Genetic Linkage Analysis of a Distinct Heritable Tumor Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* **85**: 1758- 1764
- Malchoff CD, Malchoff DM (2006) Familial Nonmedullary Thyroid Carcinoma. *Cancer Control* **13**: 106-110
- Marques AR, Espadinha C, Catarino AL, Moniz S, Pereira T, Sobrinho LG, Leite V (2002) Expression of PAX8-PPAR γ Rearrangements in Both Follicular Thyroid Carcinomas and Adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* **87**: 3947-3952

- Marques AR, Espadinha C, Frias MJ, Roque L, Catarino AL, Sobrinho LG, Leite V (2004) Underexpression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in PAX8-PPAR γ negative thyroid tumours. *British Journal of Cancer*. **91**: 732-738
- McHenry CR, Phitayakorn R (2011) Follicular adenoma and carcinoma of the thyroid gland. *The oncologist* **16**: 585-593
- McKay JD, Lesueur F, Jonard L, Pastore A, Williamson J, Hoffman L, Burgess J, Duffield A, Panotti M, Stark M, Sobol H, Maes B, Murat A, Kaarjainen H, Bertholon-Grégoire M, Zini M, Rossing A, Toubert ME, Bonichon F, Cavarec M, Bernard AM, Boneu A, Leprat F, Haas O, Lasset C, Schlumberger M, Canzian F, Goldgar DE, Romeo G (2001) Localization of a susceptibility gene for familial nonmedullary thyroid carcinoma to chromosome 2q21. *Am J Hum Genet* **69**: 440-446
- McKay JD, Thompson D, Lesueur F, Stankov K, Pastore A, Wafah C, Stolz S, Riccabona G, Moncayo R, Romeo G, Goldgar DE (2004) Evidence for interaction between the TCO and NMTC1 loci in familial nonmedullary thyroid cancer. *J Med Genet* **41**: 407-412
- Meireles AM, Preto A, Rocha AS, Rebocho AP, Máximo V, Pereira-Castro I, Moreira S, Feijão T, Botelho T, Marques R, Trovisco V, Cirnes L, Alves C, Velho S, Soares P, Sobrinho-Simões M (2007) Molecular and genotypic characterization of human thyroid follicular cell carcinoma-derived cell lines. *Thyroid* **17**: 707-715.
- Mohebbati A, Shaha AR (2012) Anatomy of thyroid and parathyroid glands and neurovascular relations. *Clinical Anatomy* **25**: 19-31
- Morris LGT, Sikora AG, Tosteton TD, Davies L (2013) The increasing incidence of thyroid cancer: the influence of access to care. *Thyroid* **23**: 885-891
- Moses W, Weng J, Kebebew E (2011) Prevalence, clinicopathologic features, and somatic genetic mutation profile in familial versus sporadic nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid* **21**: 367-371
- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Domingos R, Santos JR, Cid MO, Bugalho MJ, Leite V (2009) Correlation of RET somatic mutations with clinicopathological features in sporadic medullary thyroid carcinomas. *BR J cancer* **100**: 1777-1783
- Moura MM, Cavaco BM, Pinto AE, Leite V (2011) High prevalence of RAS mutations in RET- negative sporadic medullary thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **96**: E863-E868
- Muro-Cacho CA, Ku NNK (2000) Tumors of the thyroid gland: histologic and cytologic features- part 1. *Cancer Control* **7**: 276-287
- Na KY, Kim RM, Song E, Lee JH, Lee J, Soh E (2011) Allelic loss of susceptibility loci and the occurrence of BRAF and RAS mutations in patients with familial non-medullary thyroid cancer. *Journal of surgical oncology* **105**: 10-14
- Navas-Carrillo D, Ríos A, Rodríguez JM, Parrilla P, Orenes-Piñero E (2014) Familial nonmedullary thyroid cancer: Screening, clinical, molecular and genetic findings, *Biochimica et Biophysica Acta* **1846**: 468-476
- Ngan ES, Lang BH, Liu T, Shum CK, So MT, Lau DK, Leon TY, Cherny SS, Tsai SY, Lo SY, Khoo US, Tam PK, Garcia-Barceló MM (2009) A germline mutation (A339V) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1/NKX2.1) in patients with multinodular goiter and papillary thyroid carcinoma. *J Nat Cancer Inst* **101**: 162-175
- Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LD (2012) *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid*, 2nd edn. Philadelphia, EUA: Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams and Wilkins
- Nikiforov YE, Nikiforova MN (2011) Molecular genetics and diagnosis of thyroid cancer. *Nature Reviews Endocrinology* **7**: 569-580.

- Nikiforov YE, Ohori NP (2009) Papillary carcinoma. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR (eds) *Diagnostic Pathology and Molecular Genetics of the Thyroid*, Vol. Lippincott Williams & Wilkins: Baltimore, pp 160–213.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, DornII GW, Tallini G, Kroll TG, Nikiforov YE (2003) RAS Point Mutations and PAX8-PPAR γ Rearrangement in Thyroid Tumors: Evidence for Distinct Molecular Pathways in Thyroid Follicular Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* **88**: 2318-2326
- Nunez, R. (2001) DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. *Curr. Issues Mol. Biol.* **3**: 67–70
- Nuytemans K, Vance JM (2010) Whole exome sequencing. *Rinsho Shinkeigaku (Clinical neurology)* **50**: 952- 955
- Pacini F, Castagna MG, Cipri C, Shlumberger M (2010) Medullary thyroid carcinoma. *Clinical oncology* **22**: 475-485
- Pawlowski J, Kraft AS (2000) Bax-induced apoptotic cell death. *PNAS* **97**: 529-531
- Pellegriti G, Frasca F, Regalbuto C, Squatrito S, Vigneri R (2013) Worlwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *Journal of Cancer Epidemiology* **2013**: 1-10
- Pereira J (2012) Estudo do gene *FOXE1* e identificação de novos genes de susceptibilidade para o cancro da tiróide familiar. Tese de estágio do Mestrado de Genética Molecular e Biomedicina. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa
- Pereira JS, da Silva JG, Tomaz RA, Pinto AE, Bugalho MJ, Leite V, Cavaco BM (2015) Identification of a novel germline *FOXE1* variant in patients with familial non-medullary thyroid carcinoma (FNMTc). *Endocrine* **49**: 204-214
- Pinto AE, Silva GL, Henrique R, Menezes FD, Teixeira MR, Leite V, Cavaco BM (2013) Familial vs sporadic papillary thyroid carcinoma: a matched-case comparative study showing similar clinical/prognostic behaviour. *Eur J Endocrinol* **170**: 321-327
- Pirkmajer S, Chibalin AV (2011) Serum starvation: caveat emptor. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**: C272-279
- Pita JM, Banito A, Cavaco BM, Leite V (2009) Gene expression profiling associated with the progression to poorly differentiated thyroid carcinomas. *Br. J. Cancer* **101**:1782-1791
- Pita JM, Figueiredo IF, Moura MM, Leite V, Cavaco BM (2014) Cell cycle deregulation and *TP53* and *RAS* mutations are major events in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* **99**: E497-507
- Rabbani B, Tekin M, Mahdiah N (2014) The promise of whole-exome sequencing in medical genetics. *Journal of Human Genetics* **59**: 5-15
- Rabinovitch P (1994) Introduction to cell cycle analysis. *Phoenix Flow Systems, Inc.* USA
- Reddel RR (1999) The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **21**: 477-484
- Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuck JD, Barreda DR (2011) Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J. Vis. Exp.* 37–40.
- Ronaghi M (2001) Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* **11**: 3-11

- Rothberg JM *et al* (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* **475**: 348-352
- Sadler TW, Langman J (2006) Langman's Medical Embryology. 10th Ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins.
- Sambrook J, Russel WD (2001) Molecular cloning: A laboratory manual. *Harbour*, USA
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S (2004), Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem* **73**: 39-85
- Santos C (2013) Estudo dos genes DICER1 e C8orf48 em formas familiares de bócio multinodular e cancro da tiróide. Tese de estágio do Mestrado de Genética Molecular e Biomedicina. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa
- Scopa CD (2004) Histopathology of thyroid tumours. An overview. *Hormones* **3**:100-110.
- Shyr D, Liu Q (2013) Next generation sequencing in cancer research and clinical application. *Bio Proced Online* **15**:4
- Simons PJ, Dourmaskin RR, Turano A, Philips DE, Chesterman FC (1967) Morphological transformation of mouse embryo cells in vitro by murine sarcoma virus (Harvey). *Nature* **214**: 898-898
- Skloot R (2010) The Immortal Life of Henrietta Lacks. MacMillan, New York
- Sobrinho-Simões M, Eloy C, Magalhães J, Lobo C, Amaro T (2011) Follicular thyroid carcinoma. *Modern Pathology* **24**: S10-S18
- Spencer SL, Gerety RA, Pienta KJ, Forrest S (2006) Modeling somatic evolution in tumorigenesis. *PLOS Comput Biol* **2**: 0001-0009
- Spitzweg C, Morris JC (2002) Sodium Iodide Symporter (NIS) and Thyroid. *Hormones* **1**:22-34
- Stathatos N (2012) Thyroid Physiology. *Med Clin North Am* **96**: 165-173
- Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GR, Mudie LJ, Pleasance ED, Lau KW, Beare D, Stebbings LA, McLaren S, Lin ML, McBride DJ, Varela I, Nik-Zainal S, Leroy C, Jia M, Menzies A, Butler AP, Teague JW, Quail MA, Burton J, Swerdlow H, Carter NP, Morsberger LA, Iacobuzio-Donahue C, Follows GA, Green AR, Flanagan AM, Stratton MR, Futreal PA, Campbell PJ (2011) Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* **144**: 27-40.
- Still IH, Vince P, Cowell JK (1999) Identification of a novel gene (ADPRTL1) encoding a poly(ADP-ribosyl) transferase protein. *Genomics* **62**: 533-536
- Stoddart MJ (2011) Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols. Vol. 740, NY, EUA: Humana Press
- Suh I, Filetti S, Vriens MR, Guerrero MA, Tumino S, Wong M, Shen WT, Kebebew E, Duh Q, Clark OH (2009) Distinct loci on chromosome 1q21 and 6q22 predispose to familial nonmedullary thyroid cancer: A SNP array-based linkage analysis of 38 families. *Surgery* **146**: 1073-1080
- Taccaliti A, Silvetti F, Palmonella G, Boscaro M (2012) Anaplastic thyroid carcinoma. *Frontiers in Endocrinology* **84**: 1-7
- Tennant DA, Durán RV and Gottlieb E (2010) Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nature Reviews* **10**: 267-277

- Tomaz RA, Sousa I, Silva JG, Santos C, Teixeira MR, Leite V, Cavaco BM (2012) FOXE1 polymorphisms are associated with familial and sporadic nonmedullary thyroid cancer susceptibility. *Clin Endocrinol* **77**: 926-933
- van England M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP (1998) Annexin V-afinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* **31**: 1-9
- Venkatesan K, Rual J, Vazquez A, Stelzl U, Lemmens I, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Zenkner M, Xin X, Goh K, Yildirim MM, Simonis N, Heinzmann K, Gebreab F, Sahalie JM, Cevik S, Simon C, Smet A, Dann E, Smolyar A, Vinayagam A, Yu H, Szeto D, Borick H, Dricot A, Klitgord N, Murray RR, Lin C, Lalowski M, Timm J, Rau K, Boone C, Braun P, Cusick ME, Roth FP, Hill DE, Tavernier J, Wanker EE, Barabási A, Vidal M (2009) An empirical framework for binary interactome mapping. *Nat Methods* **6**: 83-90
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C (2000) Flow cytometry of apoptotic cell death. *J. Immunol. Methods* **243**: 167-90.
- van Staveren WC, Solis DW, Delys L, Venet D, Cappello M, Andry G, *et al.* (2006) Gene expression in human thyrocytes and autonomous adenomas reveals suppression of negative feedbacks in tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 413-418
- Vogelstein B, Kinzler KW (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **10**: 789-799
- Wang HG, Reed JC (1998) Mechanisms of Bcl-2 protein function. *Histol Histopathol* **13**: 521-530
- Xia H, Mao Q, Paulson HL, Davidson BL (2002) siRNA –mediated gene silencing *in vivo* and *in vitro*. *Nature Biotechnology* **20**: 1006-1010
- Xiong Y, Zhang L, Holloway AK, Wu X, Su L, Kebebew E (2011) Mir-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer. *Plos One* **6**: 247

VII ANEXOS

Tabela VI - Tampões e concentrações finais das soluções utilizadas para ensaios de ciclo e morte celular

Solução	Concentração final
Solução iodeto de propídio	50 µl/ml iodeto de propídio (<i>Sigma</i>); 0,1 mg/ml RNase (<i>Citomed</i> , Portugal); 0,05% (v/v) Triton X-100 (<i>Sigma</i>) + 1x PBS (- Mg ²⁺ /Ca ²⁺ , <i>GIBCO</i> TM)
Tampão de ligação anexina V	0,01M Hepes, pH 7.4 (<i>Millipore</i> , Alemanha); 0,14 M NaCl (<i>Merk</i>); 2,5 mM CaCl ₂ (<i>Sigma</i>).

Tabela VII - Sequência dos *primers* no estudo do silenciamento do gene *C8orf48*, em células TPC-1

Gene	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' 3')	Tamanho do segmento (bp)
<i>C8orf48</i> endógeno	c8orf48-1F	GTCTTAACCTGGGCAAAGG	231
	c8orf48-1R	AGTCTGCTTTTCCCTCTCCA	
<i>GAPDH</i>	GH1	CGT CTT CAC CAC CAT GGA GAA	330
	GH3	GAG GCA GGG ATG ATG TTC TG	

Tabela VIII - Sequência dos *primers* utilizados no estudo do gene *C8orf48*, em *pools* de NIH 3T3

Gene	Nome do <i>primer</i>	Sequência (5' 3')	Tamanho do segmento (bp)
<i>C8orf48</i> endógeno	c8orf48-1F	GTCTTAACCTGGGCAAAGG	231
	c8orf48-1R	AGTCTGCTTTTCCCTCTCCA	
<i>C8orf48</i> exógeno	Myc Tag-F	AGC TGA TCT CCG AGG AGG	212
	c8orf48-1R	AGTCTGCTTTTCCCTCTCCA	

Tabela IX - Informações siRNA para o gene *C8orf48*

			Número de pares de base	Percentagem G/C
siRNA <i>C8orf48</i>	Sequência sense (5' 3')	GCUCAAAGACUCUAACUUUtt	21	33%
	Sequência antisense (5' 3')	AAAGUUAGAGUCUUUGAGCtt	23	33%

Tabela X – Tampões e concentrações finais das soluções utilizadas para Western blot

Solução	Concentração final
Tampão de lise	50 µl/ml iodeto de propídio (<i>Sigma</i>); 0,1 mg/ml RNase (<i>Citomed</i> , Portugal); 0,05% (v/v) Triton X-100 (<i>Sigma</i>) + 1x PBS (- Mg ²⁺ /Ca ²⁺ , <i>GIBCO</i> TM)
Gel de corrida SDS-page	0,01M Hepes, pH 7.4 (<i>Millipore</i> , Alemanha); 0,14 M NaCl (<i>Merk</i>); 2,5 mM CaCl ₂ (<i>Sigma</i>).
Gel de fixação SDS-page	Stacking Gel Buffer (62,5 mM Tris/HCl pH 8.8); 4% Acrilamida (<i>BioRad</i>); 0,1% (v/v) SDS; 0,05% (v/v) TEMED; 1% (v/v) APS
Tampão Blot	25 mM Tris-HCl (pH 7.6) , 192 mM; glicina, 20% metanol, 0.03% SDS
Solução Destain	10% (v/v) ácido acético; 45% (v/v) metanol
TBST	50 mM Tris-Cl, pH 7.5; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Triton X-100 (<i>Sigma</i>)
TBST milk	10% (w/v) leite em pó com solução TBST
Solução ECL	100 mM Tris pH 8.8; 1,875 mM luminol; 225 µM ácido cumárico; 0,05% (v/v) peroxide de hidrogénio

